

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología

Aislamiento del locus *EARLY IN SHORT DAYS 7* (*ESD7*) y caracterización de su papel represor en la floración de *Arabidopsis thaliana*

Tesis Doctoral
Iván del Olmo Montoro
Madrid, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología

Aislamiento del locus *EARLY IN SHORT DAYS 7 (ESD7)* y caracterización de su papel represor en la floración de *Arabidopsis thaliana*

Memoria presentada por Iván del Olmo Montoro para optar al grado de Doctor por la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo realizado en el Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), bajo la dirección de los Doctores José Antonio Jarillo Quiroga y Manuel Piñeiro Galván

VºBº DE LOS DIRECTORES

EL DOCTORANDO

José Antonio Jarillo Quiroga

Manuel Piñeiro Galván

Iván del Olmo Montoro

“Cambié de senda, consultando solamente a la naturaleza; solicitando el descubrimiento de estos preciosos árboles, y haciendo a mis solas las observaciones y experiencias hasta completar finalmente mis conocimientos de este género en Botánica y Medicina, a fuerza de tiempo y constancia”

Dr. D. José Celestino Mutis y Bosio. *“El arcano de la quina”*.
Obra póstuma. Ibarra, impresor de Cámara de S.M., Madrid. 1828.

A mi familia.
Por su amor, apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

No es fácil llegar a este punto, más aún cuando se intuye lo mucho que queda por recorrer en esta carrera de obstáculos. Sin embargo, cuando pienso en aquella decisión, meditada a lo largo de los años, en el devenir profesional desde que terminé mi licenciatura, no hago más que reiterarme en que fue la más adecuada. Son muchas las personas a las que debo agradecer la oportunidad de poder haber decidido, pero en mi memoria siempre estarán los consejos recibidos por el Dr. Enrique Méndez Cormán, en paz descanse, quien permitió que comenzara a trabajar en su laboratorio de investigación del Centro Nacional de Biotecnología y quien me ayudó a forjar mi carácter con tal fin, desde aquí, un abrazo Enrique.

Todavía recuerdo entonces, como Juan Ignacio Moreno y Raquel Martín, de los mejores compañeros del centro, me incitaron a conocer al Dr. José Antonio Jarillo, a quien por encima de todo debo agradecer todo el esfuerzo, amistad y comprensión volcados en mí para que esta decisión haya dado su fruto. Me parece que el hecho de pedirme un reactivo en el laboratorio de Méndez no fue tan solo casualidad,..., fue también suerte. Empecé entonces a trabajar junto a José con material cedido por el Dr. José Miguel Martínez Zapater, material sin el cual no hubiera podido comenzar este estudio, más aún gracias a los datos aportados por la Dra. M^a del Mar Martín-Trillo, pude empezar con algo concreto, seleccionado y localizado. Más tarde, una vez comenzado nuestro trabajo, apareció en escena una de las personas mas cabales, sosegadas y analíticas que conozco, el Dr. Manuel Piñeiro, quien durante todos estos años ha colaborado en todos los sentidos con José Antonio para dirigir, coordinar y consensuar los resultados obtenidos; el presente trabajo de tesis doctoral debe lo mejor que pueda ofrecer a la orientación, sugerencias y estímulos de ambos.

En ocasiones, he necesitado ayuda a la hora de interpretar y abordar experimentos para los cuales no disponíamos de material o de suficientes medios en el laboratorio, es por ello por lo que quisiera recordar la inestimable y desinteresada ayuda aportada por el Dr. Juan Carlos del Pozo y por todos los componentes de su grupo, sin la cual, muchos de los resultados aquí expuestos no tendrían sentido. También quisiera agradecer la mano tendida de los doctores Enrique Rojo y Pilar Cubas, así como la de Adrián Valli, a la hora de enfrentarme a técnicas para las cuales carecía de experiencia.

En los últimos años no he parado de trabajar y la necesidad me obligó a duplicar esfuerzos, realizando tareas de técnico en el Departamento de Medio Ambiente del INIA a la par que continuaba con mi trabajo de investigación; gracias a la simbiosis establecida con el Dr. José María Navas, Chema, he podido no solo concluir la tesis y aprender nuevos enfoques, sino también conocer a una gran persona, a un amigo. Realizar una tesis doctoral necesita ahínco, lucha y deseo, pero sobre todo apoyo y amistad, como el recibido desde siempre por el Dr. Ignacio Arce, Nacho, a quién tengo que agradecer su amistad incondicional desde que

estudiamos CC. Biológicas en la facultad, las grandes experiencias que hemos vivido juntos y lo mucho que ha influido en mi perseverancia hacia la investigación; desde luego, eres otro modelo de estudio, no me cabe la menor duda. Por su puesto, este trabajo ha sido factible merced a la ayuda aportada por "*las chicas del labo*" Ana Lázaro, Leticia López, Laura Narro y Ángeles Gómez, que por orden de aparición en el laboratorio hemos ido compenetrándonos cada vez más, hasta llegar a una situación en la cual nos ayudamos por igual, a un equilibrio donde todos los experimentos parecen más sencillos. A los integrantes masculinos de este barco, sin los cuales me hubiera vuelto loco con el canto de las sirenas, el Dr. Eugenio J.M. Casado y en especial David Sáez, que tiene la virtud de ser paciente, escuchar por defecto y trabajar para todos de forma incondicional. También quisiera recordar al Dr. Julio Salinas y a los integrantes de su laboratorio, los doctores Rafael Catalá, Rosa López y Miguel A. Rodríguez, a mis queridísimos Fernando Novillo y Tamara Hernández, junto al gran Carlos Perea e Iñaki Herrerías "*tusikevales*".

Por último, quisiera agradecer a todas esas personas que me han rodeado desde siempre, que me rodean y me rodearán durante mucho tiempo, lo mucho que han contribuido a la finalización de este trabajo, como Esther, sin ti los últimos pasos de esta aventura hubieran sido desesperados; a mis buenos amigos Arturo, Manuel, Víctor, Mabel, Alicia, Hugo,..., que aunque ya hace tiempo dejaron esto y lo suyo,..., siempre lo han considerado como parte integrante de mi y de ellos,..., a mi familia y en particular a mi madre, por esas tertulias, por tu cariño, comprensión y amistad.

Gracias por lo que hemos logrado.

INTRODUCCIÓN	1
1. Desarrollo vegetativo y arquitectura de la inflorescencia de <i>Arabidopsis</i>.	3
1.1. Regulación de la actividad de los meristemas: mantenimiento del estado epigenético de la cromatina.	5
2. Desarrollo reproductivo: el control genético de la transición floral.	7
2.1. Variación genética natural para el tiempo de floración de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	7
2.2. Variación genética inducida en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	9
3. Control fotoperiódico de la floración: la ruta del fotoperíodo.	11
3.1. El reloj circadiano de <i>Arabidopsis</i> .	11
3.2. La percepción de la longitud del día.	12
4. Regulación de la expresión del represor floral <i>FLC</i>.	15
4.1. La ruta autónoma de la floración.	15
4.2. La ruta de la vernalización.	18
4.3. Otros represores de la actividad de <i>FLC</i> .	21
4.4. Reguladores positivos de la actividad de <i>FLC</i> .	22
5. Mecanismos de vernalización mediados por los genes <i>MAF</i> y otros genes de la familia MADS-box.	25
6. <i>SVP</i> y su papel en la respuesta a los cambios de temperatura ambiente.	27
7. La ruta de las giberelinas.	28
8. Aceleración de la floración de <i>Arabidopsis</i> bajo condiciones de estrés.	29
9. Integración de las señales que promueven la floración en <i>Arabidopsis</i>.	32
9.1. Relaciones entre los integradores florales <i>FT</i> , <i>SOC1</i> , <i>LFY</i> y <i>AGL24</i> .	32
9.2. Genes de la familia <i>FT-LIKE</i> .	36
10. Factores implicados en la remodelación de la cromatina que participan en la represión de la expresión de genes integradores, de identidad de meristemo y de órgano floral durante el desarrollo vegetativo.	38
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
11. Material vegetal.	47
12. Condiciones de cultivo de las plantas.	48
13. Análisis fenotípicos.	50
13.1. Cuantificación del tiempo de floración.	50
13.2. Medida del crecimiento de la raíz principal.	50
13.3. Cuantificación del número de células.	50
13.4. Medida de las fases del desarrollo vegetativo.	51
13.5. Medida del tamaño de los frutos.	51
14. Análisis genéticos.	51
14.1. Métodos de manipulación y análisis de DNA genómico vegetal.	51
14.2. Desarrollo de marcadores genéticos moleculares.	52
14.3. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias.	54
15. Obtención de construcciones plasmídicas:	57
15.1. Complementación de la mutación <i>esd7</i> .	57
15.2. Análisis del promotor de <i>ESD7</i> en plantas transgénicas portadoras de la construcción <i>ESD7::uidA</i> .	57
15.3. Complementación bimolecular de fluorescencia.	57
16. Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	58
17. Infiltración de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> con <i>Agrobacterium</i>.	58
18. Métodos histoquímicos.	59
18.1. Fijación de tejidos.	59
18.2. Inclusión en parafina.	59
18.3. Corte y tinción de muestras.	60
18.4. Ensayos histoquímicos de β -glucuronidasa.	60
19. Análisis de expresión.	61
19.1. Extracción de ácidos nucleicos, cuantificación, electroforesis, blots y análisis de secuencias.	61
19.1.1. Extracción de RNA.	61
19.1.2. Reacción de la transcriptasa reversa seguida de amplificación del cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	61
19.1.3. Marcaje radiactivo de sondas e hibridación de ácidos nucleicos.	63
20. Ensayos de expresión de proteínas, purificación y pull-down.	63

21. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.....	64
RESULTADOS	48
22. Aislamiento y caracterización molecular de <i>esd7</i>.....	69
22.1. Aislamiento del mutante de floración temprana <i>esd7-1</i>	69
22.2. Caracterización a nivel molecular del locus <i>ESD7</i>	70
22.2.1. Cartografiado y clonación posicional del locus <i>ESD7</i>	70
22.2.2. El locus <i>ESD7</i> codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa epsilon (ϵ), <i>AtPOL2A</i>	72
22.2.3. Aislamiento de alelos portadores de inserciones de T-DNA para <i>ESD7</i>	72
23. Aislamiento de alelos portadores de inserciones de T-DNA para <i>AtPOL2b</i>, un gen homólogo a <i>ESD7/AtPOL2a</i>.....	73
24. Aislamiento de alelos portadores de inserciones de T-DNA para la subunidad reguladora de la DNA polimerasa ϵ <i>AtDPB2</i>.....	74
25. Análisis del tiempo de floración del alelo <i>esd7-1</i> introgresado en un fondo genético Col y del alelo <i>til1-4</i> en fondo Ws/Ler.....	74
26. Análisis del tiempo de floración de dobles mutantes <i>Atpol2a Atpol2b</i>.....	76
27. Análisis del efecto de la mutación <i>esd7</i> en otros caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo.....	77
27.1. La mutación <i>esd7</i> afecta principalmente a la fase adulta del desarrollo vegetativo.....	77
27.2. La mutación <i>esd7</i> afecta a la morfología foliar.....	78
27.3. La mutación <i>esd7</i> afecta al tamaño y morfología de las flores y los frutos.....	79
27.4. La mutación <i>esd7</i> afecta al desarrollo de la raíz principal.....	80
28. La mutación <i>esd7-1</i> afecta al nivel de expresión del gen de identidad de meristemo <i>STM</i>.....	82
29. Análisis de la expresión del gen <i>ESD7</i>.....	83
29.1. La mutación <i>esd7</i> no afecta a los niveles de expresión del mensajero de <i>ESD7</i>	83
29.2. <i>ESD7</i> se expresa de forma preferencial en tejidos con una alta tasa de división.....	83
30. Regulación de la expresión de <i>ESD7</i>.....	84
30.1. Regulación de la expresión de <i>ESD7</i> por exposición de <i>Arabidopsis</i> a agentes genotóxicos.....	84
31. El mutante <i>esd7-1</i> presenta mayor susceptibilidad a MMC.....	85
32. La mutación <i>esd7</i> afecta a los niveles de expresión de genes implicados en mecanismos de reparación del DNA.....	86
33. La mutación <i>esd7</i> afecta a los niveles de expresión del gen <i>CYCB1;1</i>.....	87
34. Estructura del complejo de la DNA polimerasa ϵ de <i>Arabidopsis</i>. Estructura secundaria y terciaria de la subunidad catalítica <i>AtPOL2a</i>.....	88
34.1. La subunidad catalítica <i>POL2a</i> y la subunidad reguladora <i>DPB2</i> de la DNA polimerasa ϵ interactúan “ <i>in vivo</i> ” en el núcleo.....	88
34.2. Modelado de la estructura secundaria y terciaria de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ	89
35. Interacción del locus <i>ESD7</i> con genes de las rutas de promoción del tiempo de floración.....	91
35.1. Análisis de la posible interacción entre <i>ESD7</i> y genes de la ruta del fotoperíodo.....	91
35.2. Análisis de la posible interacción entre <i>ESD7</i> y genes de la ruta autónoma.....	92
35.3. Análisis de la posible interacción entre <i>ESD7</i> y genes de la ruta de las GAs.....	93
35.4. Análisis de la posible interacción entre <i>ESD7</i> y los integradores <i>FT</i> y <i>SOC1</i>	94
36. Análisis de la posible interacción entre <i>ESD7</i> y los loci de identidad de meristemo floral <i>LFY</i>, <i>AP1</i> y de identidad de órgano floral <i>AG</i>.....	96
37. Análisis de la expresión de genes reguladores de la transición floral.....	98
37.1. Análisis de la expresión de los genes de control del tiempo de floración <i>CO</i> , <i>FLC</i> , <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en <i>esd7-1</i>	98
37.2. <i>ESD7</i> no regula la expresión del gen <i>TWIN SISTER OF FT (TSF)</i>	100
37.3. Análisis de la expresión de los genes <i>MAF</i> en el mutante <i>esd7-1</i>	101
38. Análisis de la posible interacción entre <i>ESD7</i> y diferentes loci que codifican proteínas relacionadas con procesos de remodelación de cromatina.....	102
38.1. El locus <i>ESD7</i> interactúa sinérgicamente con el represor transcripcional <i>TFL2/LHP1</i>	102
38.2. Análisis de la expresión de los genes integradores florales <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en el doble mutante <i>esd7-1 tfl2-1</i>	103
38.2.1. El dominio carboxi-terminal de la proteína <i>ESD7</i> interactúa “ <i>in vitro</i> ” con la proteína <i>TFL2/LHP1</i>	104
38.3. Análisis de la posible interacción genética entre los loci <i>ESD7</i> y <i>EBS</i>	106
38.4. Análisis de la expresión de los genes integradores florales <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en el doble mutante <i>esd7-1 ebs-1</i>	107
39. Análisis de las interacciones entre <i>ESD7</i> y diferentes loci implicados en la replicación del DNA y en el ensamblaje de la cromatina.....	108
39.1. Análisis de la posible interacción genética entre los loci <i>ESD7</i> e <i>ICU2</i>	109
39.2. Análisis de la expresión de los genes integradores florales <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en el doble mutante <i>esd7-1 icu2-1</i>	110

39.3. La mutación <i>fas2</i> suprime el fenotipo de floración temprana de <i>esd7-1</i> .	111
39.4. Análisis de la expresión de los genes integradores florales <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en el doble mutante <i>esd7-1 fas2-1</i> .	112
40. Análisis transcriptómico global del mutante <i>esd7-1</i> en condiciones de DC.	113
41. Análisis de la expresión del gen <i>AG</i> y de algunos homólogos <i>AGL</i> en dobles mutantes <i>esd7 icu2</i>, <i>esd7 tfl2</i> y <i>esd7 fas2</i>.	117
42. Regiones discretas de la cromatina de los loci <i>FT</i> y <i>AG</i> están enriquecidas en las marcas epigenéticas activadoras Ac-H3 y trimetil-H3K4 en el mutante <i>esd7-1</i>.	118
DISCUSIÓN	121
43. Aislamiento de <i>esd7-1</i>, un mutante de floración temprana con alteraciones fenotípicas pleiotrópicas tanto en caracteres vegetativos como reproductivos.	123
44. <i>ESD7</i> codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ, una proteína que podría formar parte de un complejo homólogo a la DNA polimerasa ϵ de levaduras en <i>Arabidopsis</i>.	124
45. <i>ESD7</i> está implicado en el control de la transición floral.	129
46. <i>ESD7</i> regula la expresión de genes de identidad de meristemo apical y de tipo celular en el meristemo radicular.	131
47. <i>ESD7</i> podría estar implicado en mecanismos de reparación del DNA en <i>Arabidopsis</i>.	133
48. <i>ESD7</i> interacciona física y genéticamente con TFL2/LHP1 en <i>Arabidopsis</i>.	136
49. <i>ESD7</i> necesita la actividad de <i>FAS2</i> para ejercer su función en la represión de la transición floral.	137
50. <i>ESD7</i> podría regular el reclutamiento de factores que modifican la acetilación y metilación de la histona H3 de diferentes regiones del genoma de <i>Arabidopsis</i>.	139
CONCLUSIONES	141
BIBLIOGRAFÍA	145

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABRC	<i>Arabidopsis Biological Resource Center of Ohio State University.</i>
α - ³² P-dCTP	α - ³² P- Deoxicitidina trifosfato.
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome.</i>
BLE	Bleomicina.
BSE	<i>Back-Scattered Electron Detector.</i>
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence.</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid.</i>
cM	Centimorgan.
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation.</i>
DAPI	<i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole.</i>
dCAPS	<i>Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences.</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid.</i>
DPI	Días post-infiltración.
Emb	Embrionario.
EST	<i>Expressed sequence tag.</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein.</i>
GM	<i>Growth medium.</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase.</i>
GUS	<i>β-D-glucuronidase.</i>
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid.</i>
INDEL	<i>Insertion/deletion Polymorphism.</i>
Kb	Kilobase.
LTSEM	<i>Low-Temperature-Scanning-Electron-Microscopy.</i>
Mb	Megabase.
μ E m-2 s-1	μ Einsteins m-2 s-1.
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid.</i>
MMC	Mitomicina C.
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid.</i>
MS	Murashige y Skoog.
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Centre.</i>
NCBI	<i>Nacional Center of Biotechnology Information.</i>
p/v	Peso/volumen.
pb	Pares de bases.
PBS	<i>Phosphate buffered saline.</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction.</i>
PIPES	<i>Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic) acid.</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride.</i>
r.p.m	revoluciones por minuto.
RNA	<i>Ribonucleic acid.</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR.</i>
SEM	<i>Scanning-Electron-Microscopy.</i>
SSLP	<i>Single Sequence Length Polymorphisms.</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA.
T-DNA	<i>Transferred DNA.</i>
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research.</i>
TNT	<i>Transcription & Translation.</i>
UTR	Unstranlated Region.
v/v	volumen/volumen.
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein.</i>

During the first stages of post-embryonic development, the shoot apical meristem (SAM) gives rise to vegetative organs and once the SAM acquires competence, it undergoes the floral transition and begins the production of reproductive organs with specific patterns of cell differentiation. The timing of the floral transition is controlled by a combination of endogenous and environmental signals generating the characteristic plasticity that allows plant species to optimize their adaptation to the environment. Screens for flowering-time mutants in rapid-flowering backgrounds have been effective in genetically defining several pathways that regulate flowering time, including the photoperiod, the autonomous and the vernalization pathways. In this work, we describe the isolation and molecular characterization of *early in short days7-1* (*esd7-1*), a viable mutation displaying early flowering phenotype and pleiotropic defects in both vegetative and reproductive development. Thus, *esd7-1* mutations causes early flowering independently of photoperiod, shortened inflorescence internodes and altered leaf and root development. Beside, the epidermal cells of leaves revealed that *esd7* mutant possesses fewer cells than the wild type plants and the RAM were found to exhibit an altered disposition that might correlated with the abnormal expression pattern of marker genes. *EARLY IN SHORT DAYS 7* (*ESD7*) gene encoding the catalytic subunit of the DNA polymerase epsilon (ϵ), *AtPOL2a*. This enzyme has been involved in other organisms in diverse processes such as DNA replication, DNA repair, chromatin remodelling and transcriptional silencing. *esd7-1* was a hypomorphic allele whereas KO alleles displayed an embryo-lethal phenotype, suggesting that this gene is essential for the proper embryo development and viability. *ESD7/AtPOL2a* is expressed ubiquitously at low levels in all the tissues analyzed and its expression is up-regulated by genotoxic stress. Thus, the mutant showed higher sensitivity to these agents than wild type plants and altered expression of genes involved in DNA repair mechanisms by homologous recombination such as *RAD51*, *BRCA1*, *BRCA2* and *GR1*. *esd7* early flowering phenotype requires functional FT and SOC1 proteins and might be related to the deregulation of AG and AG-like gene expression found in *esd7*. Loci involved in the modulation of the chromatin structure dynamic, such as *TFL2* and *EBS*, which also negatively regulate FT expression, were found to interact genetically with *ESD7*. In fact, the carboxy terminus of *ESD7* interacted with *TFL2* in vitro. Moreover, *fasciata2* (*fas2*) mutations suppressed *esd7* early flowering phenotype and *INCURVATA 2* (*ICU2*) was found to be epistatic to *ESD7*. Discrete regions of the chromatin of FT and AG loci were enriched in acetylated H3 and trimethylated H3K4 activating epigenetic marks in the *esd7-1* mutant. We concluded that *ESD7* might be participating in processes involved in chromatin-mediated cellular memory and thus, DNA pol ϵ in addition to its role in DNA replication and DNA repair mechanisms, serves a crucial function in chromatin-maintaining gene silencing in plants, and reinforce the involvement of chromatin remodelling in the floral transition control.



INTRODUCCIÓN

Inflorescencia del mutante *esd7-1*

Las plantas son organismos sésiles que han desarrollado mecanismos que les permiten percibir las señales ambientales y adaptar su desarrollo a los cambios que se producen en el medio (Jarillo et al., 2008). Este hecho se traduce en una amplia variedad de formas y hábitos de crecimiento, apreciables tanto al comparar especies distintas como individuos de la misma especie mantenidos bajo condiciones ambientales diferentes.

Tras un periodo de desarrollo vegetativo las plantas experimentan un cambio de fase a desarrollo reproductivo, denominado transición floral (Kobayashi y Weigel, 2007). Esta transición de fase es una de las más dramáticas que experimentan las plantas a lo largo de su desarrollo y es un proceso finamente regulado que está modulado en respuesta tanto a factores ambientales como endógenos, lo que asegurará en última instancia el éxito reproductivo de la planta (Coen, 1991; Simpson y Dean, 2002; Bäurle y Dean, 2006; Kobayashi y Weigel, 2007; Jarillo et al., 2008). Los factores endógenos dependen fundamentalmente del estado de desarrollo de la planta, mientras que los factores ambientales que regulan la transición floral son principalmente el fotoperiodo, la intensidad y la calidad de la luz que recibe la planta y la temperatura. En concreto la vernalización, que es la aceleración del tiempo de floración que se produce como consecuencia de la exposición a periodos prolongados de bajas temperaturas, es uno de los principales determinantes del ciclo de vida de muchas especies vegetales (Schmitz y Amasino, 2007). La importancia que tiene el control del tiempo de la floración en la productividad de especies cultivadas hace que además sea un proceso con un alto potencial biotecnológico.

1. Desarrollo vegetativo y arquitectura de la inflorescencia de *Arabidopsis*.

El proceso continuo de desarrollo y de diferenciación de los órganos de las plantas es posible gracias a unas agrupaciones de células indiferenciadas denominadas meristemos, que se localizan tanto en el extremo de los tallos como en el de las raíces y cuya función principal es la de proveer nuevas células que mantengan el crecimiento de la planta (Sablowski, 2004; Verdeil et al., 2007). Durante la embriogénesis, en las plantas se establece el eje apical-basal y la mayoría de los órganos terminan de desarrollarse o se forman durante las etapas post-embrionarias a partir de los meristemos apical (SAM) y radicular (RAM), donde se mantiene un equilibrio dinámico entre la división y la diferenciación celular que les permite conservar un tamaño estable durante el desarrollo. Este estado de equilibrio persiste durante toda la vida de la planta, produciéndose un crecimiento indeterminado en los meristemos vegetativos y de inflorescencia, localizados en este pequeño grupo de células que se auto-renuevan y que son funcionalmente similares a las células madre presentes en los animales (Evans y Barton, 1997; Kerstettera y Hake 1997; Sablowski, 2004). Sin embargo, el desarrollo de órganos laterales requiere que disminuya la tasa de división celular para que ciertos grupos de células se diferencien, generándose de esta forma los primordios en la periferia del meristemo. Así, durante el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis*, el meristemo apical desarrolla en sus flancos de forma reiterada primordios foliares, que darán lugar a una roseta con ausencia de

elongación de los entrenudos del tallo, hasta el momento en el que se produce la transición floral (Telfer et al., 1997). Cuando se induce dicha transición, se produce la elongación de los entrenudos, el desarrollo de las hojas caulinares del tallo principal y finalmente la producción de flores en lugar de hojas, dando lugar a la formación de una inflorescencia (figura 1).

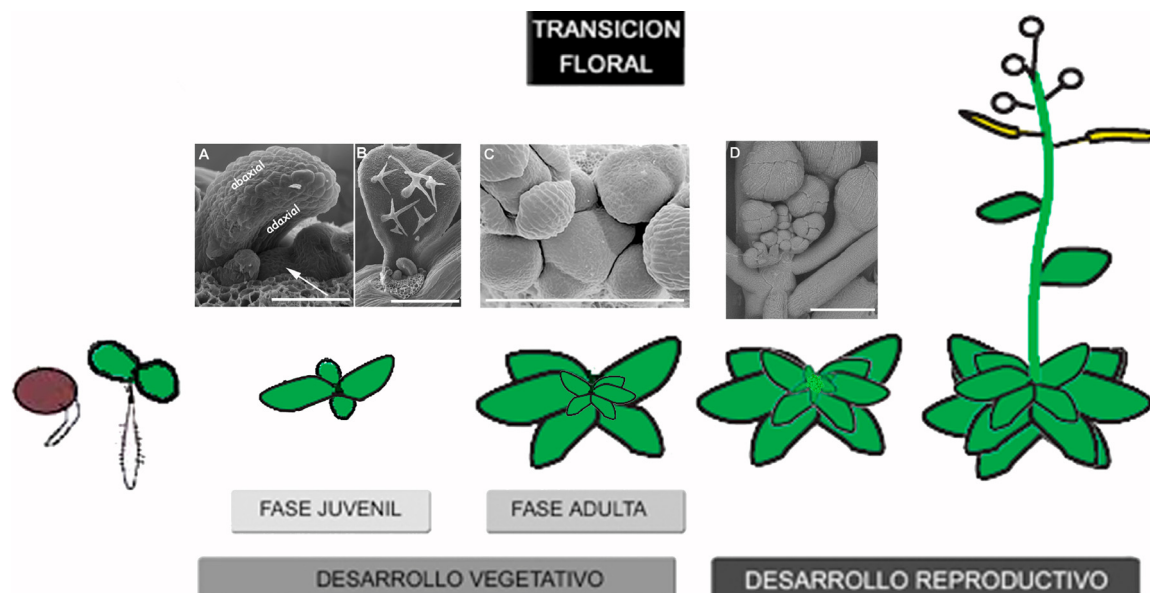


Figura 1. Transiciones de fase del desarrollo vegetativo a reproductivo en *Arabidopsis thaliana*. Tras la germinación, se distinguen una fase vegetativa juvenil y una adulta. Posteriormente acontece la transición del desarrollo vegetativo a desarrollo reproductivo. A: Hojas juveniles desarrollándose junto al SAM; B: Disposición de tricomas en la parte adaxial de las hojas juveniles; C: SAM tras la inducción floral desarrollándose los primeros primordios florales; D: meristemo de la inflorescencia.

Durante el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis* se pueden distinguir tres etapas que se diferencian a nivel morfológico por el tamaño, la forma y la disposición de las hojas, así como por la distribución de los tricomas en las superficies abaxial y adaxial de las mismas (Telfer et al., 1997). En la primera etapa denominada fase juvenil, las hojas son pequeñas, redondeadas, con tricomas en la parte adaxial y se disponen con una filotaxia decusada, iniciándose como parejas opuestas en la roseta juvenil. La segunda etapa denominada fase adulta, se caracteriza porque las hojas son más grandes, ovaladas, con tricomas en ambas superficies, y aparecen en la roseta adulta siguiendo una filotaxis en espiral. En la última etapa del desarrollo vegetativo se desarrollan hojas, denominadas brácteas u hojas caulinares, que se disponen en la base de las ramas laterales del tallo de la inflorescencia. Estas hojas poseen una forma lanceolada, presentan pocos tricomas en el haz y se disponen también con una filotaxis en espiral (Medford et al., 1992; Schultz y Haughn et al., 1993). El cambio morfológico más evidente entre la roseta adulta y la inflorescencia es la elongación de los entrenudos que resulta en la separación de las brácteas de las hojas de roseta y en la formación de una inflorescencia de tipo racimo simple. Esta elongación de entrenudos tiene lugar tras la inducción floral, en la cual se forman flores en los nudos, sin brácteas en la base. Una vez

formada la inflorescencia principal, los meristemos axilares de las hojas de roseta pueden dar lugar a ramas laterales en las que se repite de nuevo la misma estructura.

1.1. Regulación de la actividad de los meristemos: mantenimiento del estado epigenético de la cromatina.

El análisis genético de las actividades del SAM y RAM ha desvelado algunos de los reguladores claves de este proceso (Chandler et al., 2008). La pluripotencia celular, la frecuencia de la división de las células del meristemo apical y en consecuencia, el mantenimiento de las células troncales del tallo están regulados por una compleja red de factores de transcripción tales como *WUSCHEL* (*WUS*), *KNOTTED1-like* (*KNOX*), *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*), *KNOTTED1-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA 1* (*KNAT1*) y por proteínas señalizadoras codificadas por los genes *CLAVATA* (*CLV*). Durante la formación de los primordios de los órganos, las células de la zona periférica del meristemo apical empiezan a diferenciarse; esta diferenciación va acompañada de la represión de alguno de estos genes específicos del meristemo y de la activación de algunos genes promotores de la organogénesis (Jarillo et al., 2009); de igual manera, en el RAM el gen homeótico *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*) parece tener una función directa en la señalización y mantenimiento de las células troncales de la raíz (Sarkar et al., 2007).

La regulación de la expresión de estos genes de identidad de meristemo es clave para poder comprender cómo y cuando tienen lugar los procesos de cambio de fase durante el desarrollo vegetal. Uno de los principales mecanismos implicados es la regulación epigenética de la expresión génica, que implica tanto la metilación del DNA como las modificaciones de las histonas de los nucleosomas y la regulación de la estructura de la cromatina (Vaillant y Paszkowski, 2007). Así se han descrito una serie de factores remodeladores de la cromatina que están implicados en la regulación de la expresión espacio-temporal de factores de transcripción claves tanto para la identidad del meristemo como para la organogénesis de hojas y/o flores, cuyas mutaciones originan disfunciones a nivel de los meristemos apical y radicular (Jarillo et al., 2009). En los organismos pluricelulares, los estados de la cromatina deben mantenerse fielmente entre las células proliferantes y las células hijas, pero a diferencia de los animales, en las plantas los cambios epigenéticos se producen no sólo durante la embriogénesis, sino también durante las transiciones post-embionarias del desarrollo, tales como la organogénesis y la floración (Henderson y Jacobsen, 2007), lo cual implica que estén sujetos a este proceso tanto la actividad de los meristemos como el mantenimiento de la identidad celular y la formación de los primordios de los órganos. Sin embargo, se desconoce en gran medida cómo los diferentes factores que participan en el establecimiento y la remodelación de la cromatina interaccionan para coordinar la regulación de la actividad y la organización de los meristemos. En los animales, este mecanismo de mantenimiento de la cromatina es especialmente importante durante la fase de síntesis del DNA, cuando la información genética se duplica (Groth et al., 2007). El DNA recién sintetizado entonces debe

ensamblarse en los nucleosomas maduros, manteniéndose la integridad del estado epigenético a través de mecanismos que implican las actividades de la horquilla de replicación (Hoek y Stillman, 2003; Franco et al., 2005). En este sentido, el complejo proteico de unión a histonas CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1 (CAF-1) facilita el ensamblaje “*de novo*” de los nucleosomas durante la replicación del DNA (Ramírez-Parra y Gutiérrez, 2007a). Así, tanto en levaduras como en metazoos, CAF-1 actúa como un complejo chaperona de histonas que participa en la reconstitución de la cromatina después de la replicación del DNA y es necesario para mantener el estado de la heterocromatina durante la mitosis (Krude, 1995; Verreault et al., 1996; Krude, 1999; Shibahara y Stillman, 1999; Takami et al., 2007; Ramírez-Parra y Gutiérrez 2007b). Se desconoce si este complejo desempeña esta función en plantas, aunque se requiere para la diferenciación celular (Exner et al., 2006) y se postula que está implicado en diferentes fases del desarrollo a través de los análisis funcionales realizados a nivel genético y transcripcional (Exner et al., 2006; Schönrock et al., 2006) y a nivel de la regulación transcripcional de alguno de sus componentes durante el ciclo celular (Ramírez-Parra y Gutiérrez 2007a).

En *Arabidopsis*, los loci *FASCIATA1* (*FAS1*) y *FAS2* codifican dos de las tres subunidades del complejo CAF-1 (Kaya et al. 2001), correspondientes a las subunidades del complejo de mamíferos y levaduras p60/CAC1 y p150/CAC2 respectivamente (Leyser y Furner, 1992; Kaya et al. 2001). *fas1* y *fas2*, son los únicos mutantes viables de pérdida de la función del complejo CAF-1 y ambos presentan las mismas anomalías en el desarrollo de los meristemas, como son la fasciación y el crecimiento reducido de las raíces (Leyser y Furner, 1992). En estos mutantes se altera la expresión de determinados genes implicados en el mantenimiento de los meristemas apical y radicular tales como *WUS* y *SCARECROW* (*SCR*; Kaya et al., 2001), un factor de transcripción necesario para el mantenimiento de la identidad de las células madre en el centro quiescente del meristemo radicular (Di Laurenzio et al., 1996; Wysocka-Diller et al., 2000; Kaya et al., 2001). Asimismo, el homólogo de la tercera subunidad de este complejo, *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1* (*MSI1*) es también necesario para el correcto desarrollo del meristemo apical (Kaya, 2001; Hennig et al., 2003) y su función es esencial para el desarrollo embrionario. Además, MSI1 también se encuentra formando parte de complejos del Grupo Polycomb (PcG) implicados en el desarrollo del embrión y de las semillas (Köhler et al., 2003, Hennig et al., 2005).

Al igual que en los mutantes *fas*, los defectos en la estabilidad de la cromatina también podrían explicar las alteraciones en el desarrollo observadas en los mutantes *brushy1* (*bru1*)/*mgoun3* (*mgo3*)/*tonsoku* (*tsk*) (Guyomarc'h et al., 2004; Takeda et al., 2004; Suzuki et al., 2004). Estas mutaciones inducen la desorganización del meristemo apical y radicular, originando fasciación del tallo y una filotaxia anormal. La estructura de la proteína BRU1/MGO3/TSK sugiere que podría formar parte de un complejo de proteínas nucleares posiblemente implicado en la organización de la cromatina (Takeda et al., 2004; Cools y De

Veylder, 2008). Su relación con el complejo CAF-1 no está bien establecida, si bien los análisis genéticos sugieren la existencia de interacciones genéticas entre ambos loci que podría revelar dianas comunes en algunos aspectos concretos del desarrollo (Takeda et al. 2004). Además de estos, otros factores remodeladores de la cromatina entre los que se incluirían *TOUSLED* (*TSL*), *AtBRAHMA* (*AtBRM*) y *SPLAYED* (*SYD*) (Roe et al. 1993; Wagner y Meyerowitz 2002; Ehsan et al. 2004; Farrona. et al. 2004) pueden regular diferentes aspectos del funcionamiento de los meristemas y actuar en diferentes etapas del desarrollo; por esta razón, muchos de ellos, como algunos factores que forman parte de ciertos complejos PcG, los discutiremos en apartados posteriores, a fin de posibilitar una mejor comprensión de su función en el proceso de la transición floral.

2. Desarrollo reproductivo: el control genético de la transición floral.

Arabidopsis thaliana se ha empleado como especie modelo en el estudio de numerosos procesos de desarrollo incluida la transición floral, de forma que tanto el análisis de la variabilidad genética existente entre las poblaciones naturales de *Arabidopsis* como la caracterización de mutantes afectados en el tiempo de floración, ha permitido en los últimos años establecer un modelo conceptual que engloba una serie de rutas de inducción de la floración, así como revelar la existencia de diferentes genes represores de la transición floral (Bäurle y Dean, 2006; Pouteau et al., 2008; Turck et al., 2008).

Desde el punto de vista del tiempo de floración *Arabidopsis* es una planta facultativa de día largo (DL; 16 h de luz al día), lo que significa que florece antes en un régimen de DL que en un régimen de día corto (DC; 8-10 h de luz al día), aunque es capaz también de florecer en estas condiciones de DC. Por lo tanto, no muestra ningún requerimiento obligado de fotoperiodo para su floración, aunque florezca más rápidamente cuando los días se alargan. Además, algunos ecotipos son capaces de responder a tratamientos de vernalización por la exposición a las temperaturas bajas típicas del invierno o florecer cuando la temperatura de crecimiento aumenta durante la primavera (Martines-Zapater et al., 2004).

2.1. Variación genética natural para el tiempo de floración de *Arabidopsis thaliana*.

Como planta anual, las accesiones de *Arabidopsis* se clasifican como variedades anuales de verano o de invierno con respecto a su floración, a los requerimientos de vernalización y a los mecanismos genéticos de control de la dormancia de semillas (Napp-Zinn, 1985; Donohue, 2002). Las accesiones de invierno germinan a finales del verano o en el otoño; durante el invierno se desarrollan sus rosetas e inician la fase reproductiva en la primavera. Por su parte, las variedades de verano, también denominadas de ciclo rápido, son capaces de completar todas las fases de su ciclo de vida durante la misma temporada de primavera. Sin embargo, como se comentó anteriormente, cabe señalar que la mayoría de los tipos anuales de verano también pueden seguir la estrategia anual de invierno, hibernando como rosetas (Pigliucci,

2003; Koornneef et al., 2004). En general, las accesiones del sur de Europa son de invierno o de verano, mientras que la mayoría de las del norte de Europa son típicamente de invierno y se observan principalmente por encima de los 45° N (Shindo et al., 2005).

La diversidad encontrada para el tiempo de floración en las distintas accesiones naturales de *Arabidopsis* es probablemente el reflejo de procesos de adaptación de la especie para ajustar la floración a las diferentes condiciones ambientales de fotoperiodo y temperatura, dependiendo de la zona del globo donde éstas crezcan. De esta forma se han descrito loci tales como *FRIGIDA (FRI)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, cuya variación es fundamentalmente responsable de las diferentes respuestas a la vernalización que muestran las numerosas accesiones de *Arabidopsis* (Michaels y Amasino, 2000; Sheldon et al., 2000; Ratcliffe et al., 2001; Scortecci et al., 2001; Ratcliffe et al., 2003; Scortecci et al., 2003; Schmitz y Amasino, 2007), ya que tras una exposición prolongada a bajas temperaturas, los niveles de *FLC* disminuyen. Así, mientras que las variedades de invierno que responden a vernalización presentan alelos funcionales y dominantes de *FRI* y *FLC* (Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon et al., 1999; Johanson et al., 2000), las variedades anuales de verano presentan alelos de *FRI* no funcionales y carecen de requerimientos de vernalización para florecer (Johanson et al., 2000; Gazzani et al., 2003; Shindo et al., 2005). Entre los ecotipos empleados en el laboratorio, Columbia (Col) posee un alelo de *FRI* no funcional y un alelo activo de *FLC* (Gazzani et al., 2003; Shindo et al., 2005). En el caso del ecotipo Landsberg *erecta (Ler)*, ni el alelo de *FLC* ni el de *FRI* son funcionales (Gazzani et al., 2003; Shindo et al., 2005). *FRI* es un regulador positivo de *FLC*, y codifica una proteína de función bioquímica desconocida pero que contiene dominios que probablemente estén implicados en interacciones proteína-proteína (Johanson et al., 2000). *FRI* retrasa la floración a través de la activación de la expresión de *FLC* (Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon et al., 1999) y las mutaciones de pérdida de función de *FLC* suprimen el efecto de *FRI* sobre el tiempo de floración (Michaels y Amasino, 2001). De este modo, desde un punto de vista fisiológico, la interacción entre *FRI* y *FLC* determina la capacidad de la planta para responder a la vernalización, y establece un mecanismo que evitaría que las plantas florezcan antes del invierno y que facilite la floración en primavera tras la exposición prolongada al frío. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, las accesiones de ciclo rápido pueden florecer en ausencia de vernalización. Esto es debido a que las mutaciones que han acontecido de forma natural en esta especie o bien han afectado al locus *FRI*, en cuyo caso la expresión de *FLC* no se ve activada, o bien han afectado al propio locus *FLC* (Johanson et al., 2000; Gazzani et al., 2003; Michaels et al., 2003a). Por lo tanto, las accesiones de ciclo rápido parecen haber evolucionado a partir de plantas anuales de invierno a través de la pérdida o reducción de función de los genes *FRI* o *FLC*, ya que existen ventajas para su propagación en climas más cálidos.

Por otro lado, se han aislado variantes naturales para genes que afectan a la respuesta al fotoperiodo y a la temperatura como son *EARLY DAYLENGTH INSENSITIVE /*

CRYPTOCHROME 2 (*EDI/CRY2*), *PHYTOCHROME C* y *D* (*PHYC* y *PHYD*) y *FLOWERING LOCUS M* (*FLM/MAF1*), (Aukerman et al., 1997; el-Assal et al., 2001; Werner et al., 2005; Balasubramanian et al., 2006a, 2006b). *PHYD* es un represor floral, mientras que *CRY2* es un inductor de la floración. Ambos codifican para apoproteínas de fotorreceptores de luz roja y luz azul, respectivamente. Por su parte, *PHYC* codifica la apoproteína del fitocromo C, otro receptor de luz roja que participa en la regulación del tiempo de floración en función de la latitud, contribuyendo a la variación natural de la floración en *Arabidopsis* (Balasubramanian et al., 2006a). Por último, *FLM/MAF1* codifica un factor de transcripción que actúa modulando la inducción de la floración en respuesta a leves aumentos de la temperatura de crecimiento, (Balasubramanian et al. 2006b), habiéndose observado diferencias en la expresión de genes tipo *MADS AFFECTING FLOWERING* (*MAF*; Ratcliffe et al., 2003), entre los que se encuentra *FLM/MAF1*, entre Col y las accesiones de floración tardía Pitztal y Stockholm.

2.2. Variación genética inducida en *Arabidopsis thaliana*.

El estudio del control genético del tiempo de la floración también se ha llevado a cabo mediante el aislamiento de mutantes que presentasen un fenotipo de floración alterado. Entre ellos cabe distinguir los mutantes de floración tardía, reflejo de la pérdida de función de activadores de la floración y los de floración temprana, que pueden afectar a represores florales. Los tardíos se clasificaron en base a su respuesta a factores medioambientales (Martínez-Zapater y Somerville, 1990; Koornneef et al., 1991; Martínez-Zapater et al., 1994; Koornneef et al., 1998a; Mouradov et al., 2002; Simpson y Dean, 2002); posteriormente, el análisis fenotípico de dobles y triples mutantes afectados en el tiempo de floración, junto con la determinación de las relaciones genéticas existentes entre los loci implicados, permitieron postular un modelo conceptual para el control genético de las rutas de inducción de la floración (Putterill et al., 1995; Koornneef et al., 1998a; Koornneef et al., 1998b; Simpson et al., 1999; Reeves y Coupland, 2001; Ausín et al., 2005). Así se formuló un modelo genético que proponía la existencia de al menos cuatro rutas parcialmente independientes que convergen en la regulación de una serie de genes que funcionan a modo de integradores de señales (Nilsson et al., 1998; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Samach et al., 2000; Blázquez y Weigel, 2000; Lee et al., 2000; Hepworth et al., 2002; Moon et al., 2003). Estas rutas comprenden la del fotoperiodo, que se activa en respuesta a DL, la ruta autónoma, que podría participar en la regulación de la floración en respuesta a la temperatura de crecimiento, la ruta de vernalización, que acelera la floración por exposición prolongada a bajas temperaturas y que junto con la autónoma regulan la expresión del represor floral *FLC*, y la ruta de las giberelinas (GAs), que tiene un papel fundamental en condiciones de DC (Bäurle y Dean, 2006; Imaizumi y Kay, 2006; Schmitz y Amasino, 2007) (figura 2). Estas rutas convergen en genes integradores de información tales como *LEAFY* (*LFY*), *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 / AGAMOUS LIKE 20* (*SOC1/AGL20*) (Turck et al., 2008), que permiten modular con precisión el momento de inicio de la floración en respuesta tanto las señales endógenas como las medioambientales, facilitando la adaptación a

las condiciones imperantes. Una vez activados, estos genes integradores inducen la expresión de genes específicos que participan en la determinación de la identidad del meristemo floral, que a su vez regularán a los genes de identidad de órgano floral, para iniciar así la producción de los primeros meristemos florales (Bernier y Périlleux, 2005) (figura 2).

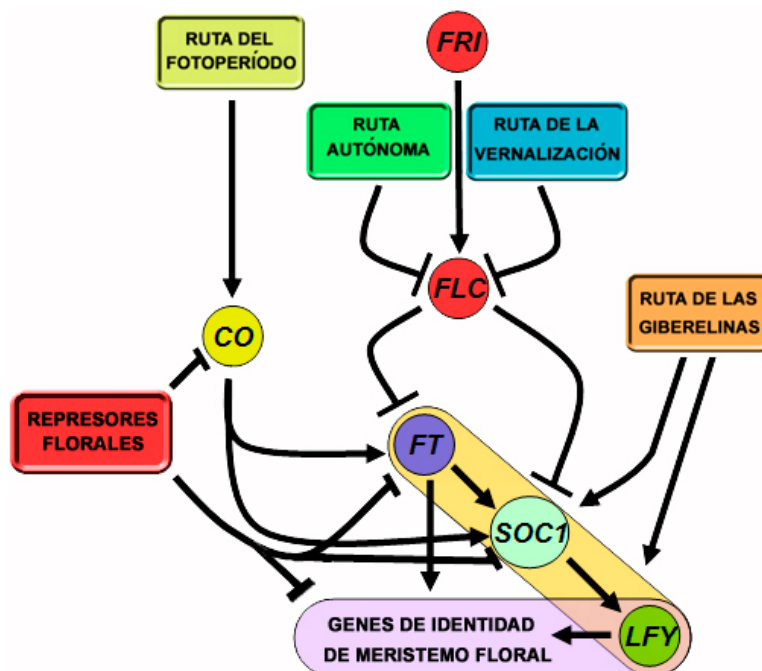


Figura 2. Rutas promotoras y represoras propuestas en el modelo del control del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*, y su convergencia a nivel de los integradores florales.

Por otra parte, un aspecto de la regulación de la transición floral que permanece en gran medida desconocido es el papel funcional que desempeñan los represores de la transición floral y como estos interaccionan con las rutas de inducción de la floración (Sung et al. 2003; Pouteau et al. 2004; Pouteau et al., 2008). Mediante el aislamiento de mutantes de floración temprana, se han identificado genes que juegan un papel represor en el control del tiempo de floración y se están comenzando a dilucidar sus mecanismos de acción. Muchos de estos mutantes tempranos presentan un alto grado de pleiotropía, que bien son consecuencia de la existencia de distintos procesos generales de regulación génica que convergen sobre dianas claves de la transición floral (Pouteau et al. 2004), o revelan la posible existencia de reguladores que afecten al control de distintos procesos de desarrollo, además del tiempo de floración. Queda aún por resolver como actúan muchos de los represores de la transición floral y a que nivel se integran en este modelo. Por ello, es necesario describir detalladamente la posible interacción existente con algunas de las rutas inductoras, vinculando en cada momento la posible regulación ejercida por dichos represores. Además, todos los escrutinios genéticos que se han realizado encaminados a aislar mutantes de floración temprana en diversos laboratorios, indican que el número de represores es alto y que a pesar del avance experimentado hasta el momento, las colecciones generadas con estos abordajes no han saturado totalmente la gran variedad de genes involucrados en procesos de represión floral (Sung et al., 2003; Pouteau et al., 2004). Así por ejemplo, recientemente se ha aislado un

grupo de mutantes de floración temprana que muestran un patrón de respuesta fotoperiódica muy dispar (Pouteau et al., 2008) que definirían umbrales de fotoperiodo más allá de la máxima respuesta observada en condiciones de DL y DC. A continuación describimos brevemente los distintos genes que forman parte de las rutas de control del tiempo de floración descritas anteriormente.

3. Control fotoperiódico de la floración: la ruta del fotoperiodo.

Esta ruta inicialmente se estableció a partir de la identificación de una serie de mutantes que presentaban un fenotipo de floración tardía únicamente en condiciones fotoperiódicas inductivas, y además no responden a vernalización (Redei, 1962; Koornneef et al, 1991); posteriormente se han identificado mutantes que muestran un fenotipo de floración temprana y que también están afectados en posibles componentes de esta ruta. Los mutantes tardíos de esta ruta son insensibles al fotoperiodo, al tener tiempos de floración idénticos tanto en DL como en DC (Searle y Coupland, 2004; Turck et al., 2008). Históricamente, en esta ruta se incluyeron los loci *CONSTANS* (*CO*), *CRY2*, *GIGANTEA* (*GI*), *FWA*, *FD*, *FE* y *FT* (Searle y Coupland 2004). Los mutantes *co*, *gi* y *fha* (*cry2*) poseen un fenotipo de floración tardía sólo en condiciones de DL, mientras que los restantes todavía mantienen cierto nivel de respuesta al fotoperiodo (Coupland, 1995; Putterill et al., 1995). Por otro lado, la sobre-expresión de la mayoría de estos genes causa fenotipos de floración temprana (Kardailsky et al, 1999; Kobayashi et al, 1999; Borner et al, 2000; Lee et al, 2000; Onouchi et al, 2000; Samach et al, 2000; Putterill et al., 2004; Bäurle y Dean, 2006).

Asimismo, se han aislado mutantes con fenotipos de floración temprana que están afectados en posibles componentes del reloj circadiano o en proteínas que regulan las vías de entrada al reloj. Mutaciones en loci tales como *EARLY FLOWERING3* (*ELF3*), *TIMING OF CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN1* (*TOC1*)/*PSEUDO RESPONSE REGULATOR 1*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*), *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1* (*CCA1*), *EARLY FLOWERING 4* (*ELF4*) y *LUX ARRHYTHMO* (*LUX*) causan fenotipos de floración temprana en condiciones de DC, y muestran alteraciones en el comportamiento del oscilador endógeno (Más, 2008). Por lo tanto, la ruta de floración dependiente del fotoperiodo podría ser separada en dos dominios funcionales: el reloj circadiano y un mecanismo de percepción de la longitud del día regulado de forma circadiana.

3.1. El reloj circadiano de *Arabidopsis*.

La información procedente de las señales de la luz, percibida a través de los fotorreceptores de luz roja y de luz roja lejana PHYA-E y por los fotorreceptores de luz azul CRY1 y CRY2, ajusta el oscilador básico del reloj circadiano, que consiste en un bucle de retroalimentación negativa con dos proteínas que se activan por la mañana, CCA1 y LHY y tres que lo hacen por la noche, TOC1, ELF4 y LUX (Wang y Tobin, 1998; Schaffer et al, 1998;

Strayer et al, 2000; Alabadí et al, 2001; Doyle et al, 2002; Hazen et al, 2005; Onai y Ishiura 2005; Jarillo et al., 2008).

LHY, *CCA1* y *TOC1* forman parte del mecanismo central que genera los ritmos circadianos en *Arabidopsis*. *CCA1* y *LHY* son similares en secuencia, en patrón de expresión (Schaffer et al, 1998; Wang y Tobin, 1998), y su función es parcialmente redundante (Alabadí et al, 2002; Mizoguchi et al, 2002). Así, en el doble mutante *lhy cca1* o en el mutante *toc1*, los ritmos circadianos son más rápidos y presentan fenotipos de floración temprana en condiciones de DC (Somers et al, 1998; Mizoguchi et al, 2002). *CCA1* y *LHY* son dos factores de transcripción tipo MYB que reprimen durante la mañana la expresión de *TOC1*, un gen tipo pseudoresponse regulador, a otro gen tipo myb denominado *LUX*, y al gen *ELF4*, que codifica una proteína sin homología a otras descritas. Por su parte, *TOC1*, *ELF4* y *LUX* están implicadas en la activación de la transcripción de *CCA1* y *LHY*, probablemente a través de mecanismos indirectos (Alabadí et al, 2001; Doyle et al, 2002; Hazen et al, 2005; Onai y Ishiura 2005). Por otro lado, *ELF3* codifica una proteína nuclear de función bioquímica desconocida, que posee dominios similares a los presentes en algunos factores de transcripción (Hicks et al., 2001) y no parece formar parte del mecanismo central del reloj circadiano; se ha propuesto que *ELF3* modula las señales procedentes de la luz hacia el oscilador central, de manera que en el mutante *elf3* la ruta de entrada de luz al reloj está permanentemente activada (McWatters et al., 2000; Hicks et al., 2001; Liu et al., 2001). Por lo tanto, la sensibilidad del reloj a los cambios de luz durante el día está regulada por *ELF3*, que funciona como un represor cíclico de la señalización mediada por la luz (McWatters et al., 2000; Covington et al., 2001). Recientemente se ha demostrado que *ELF3* junto a CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (*COP1*) controla la floración por fotoperiodo, regulando la estabilidad de *GI* (Yu et al., 2008).

Existen otras proteínas asociadas al mecanismo del oscilador endógeno, como son cuatro homólogos de *TOC1*, denominados PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 3, 5, 7 y 9 (*PRR3*, *PRR5*, *PRR7* y *PRR9*), que se han asociado con la función de reloj, ya que comparten bucles en el circuito *CCA1-LHY* (Farré et al, 2005; Mizuno, 2005; Mizuno y Nakamichi, 2005). La regulación post-traducciona l de las proteínas del reloj como es la fosforilación de *CCA1* (Daniel et al, 2004) y el control de la degradación de *TOC1* por la proteína tipo F-box *ZEITLUPE* (*ZTL*) (Más et al., 2003) son también importantes en el mecanismo del reloj circadiano.

3.2. La percepción de la longitud del día.

El proceso básico que permite a *Arabidopsis* medir la longitud de los días se basa tanto en el mecanismo de regulación circadiana de la expresión del gen *CO*, como en la regulación mediada por la luz de la actividad y de la estabilidad de la proteína *CO* (Hayama y Coupland, 2004). *CO* por lo tanto es el regulador clave de este proceso, habida cuenta de que el reloj circadiano es responsable de la expresión de *CO* por la tarde en condiciones fotoperiódicas de DL y de que la luz activa a la proteína *CO* para inducir la expresión de *FT* (Yanovsky y Kay

2003; Hayama y Coupland, 2004), por lo que solamente en condiciones de DL existe un solapamiento de los niveles máximos de expresión de *CO* con el periodo de iluminación. En cambio, en DC la expresión de *CO* se limita al periodo de oscuridad, no produciéndose activación de la proteína por luz y por lo tanto activación de la expresión de *FT* (Suárez-López et al., 2001). El gen *CO* codifica un activador transcripcional del tipo B-box con un dominio zinc-finger que, de forma dependiente de la luz, induce la expresión del gen integrador floral *FT* (Yanovsky, y Kay, 2002). Por otro lado, aunque *CO* induce la expresión de *FT*, la proteína no contiene un dominio típico de unión al DNA y por lo tanto, se postula que *CO* interacciona con factores de transcripción que se unen directamente al promotor de *FT*. Así por ejemplo, *CO* interacciona físicamente con HAP5, que forma parte del complejo heterotrimérico HAP junto a HAP2 y HAP3 (Ben-Naim et al., 2006), implicado en el reconocimiento de la caja CCAAT presente en muchos genes de *Arabidopsis*. La expresión ectópica del homólogo de *HAP5* de tomate causa un ligero adelanto de la floración en *Arabidopsis*, lo que indica que *HAP5* también podría estar implicado en la regulación de la floración (Ben-Naim et al., 2006). De hecho, existen varios sitios candidatos de unión del complejo HAP en el promotor de *FT*, por lo que se ha postulado que este complejo y en concreto HAP5, podría participar en la unión de *CO* al promotor de *FT* (Ben-Naim et al., 2006).

La abundancia del mensajero de *CO* está controlada por múltiples factores regulados por el reloj circadiano tales como *GI*, *FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT AND F-BOX 1 (FKF1)*, *ELF3*, *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)*, y *RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2 (RFI2)* (Fowler et al, 1999; Suárez-López et al, 2001; Imaizumi et al, 2003; Imaizumi et al, 2005; Chen y Ni, 2006a). *GI* y *FKF1* son activadores transcripcionales de *CO*, mientras que *ELF3*, *CDF1* y *RFI2* actúan como represores (Fowler et al. 1999; Nelson et al. 2000; Covington et al, 2001; Imaizumi et al, 2005; Chen y Ni, 2006a). *GI* es una proteína nuclear de alto peso molecular con función poco conocida (Fowler et al. 1999), que puede unirse a ZTL, para prevenir la degradación de TOC1 (Kim et al., 2007b), o bien actuar en conjunción con *FKF1* durante todo el día, modulando la degradación de factores de transcripción necesarios para regular la transcripción de *CO*, como *CDF1* (Sawa et al., 2007). En el mutante *gi* la expresión de *CO* está reprimida durante todo el día bajo cualquier condición de fotoperiodo (Suárez-López et al. 2001; Mizoguchi et al. 2005), lo que indica que la proteína *GI* es necesaria, independientemente del fotoperíodo, para que se produzca una transcripción normal de *CO*.

Por su parte, *FKF1* es una proteína F-box que participa en la inducción transcripcional de *CO* en condiciones de DL (Imaizumi et al. 2003). En el mutante de floración tardía *fkf1* no existe un pico de expresión de *CO* durante el día, y su expresión no se ve alterada durante la noche, lo que sugiere que *FKF1* es necesario para el pico de expresión de *CO* que tiene lugar al final del periodo de iluminación en DL. Además, este periodo de expresión de *CO* coincide con la mayor acumulación de la proteína *FKF1*, lo que indicaría que *FKF1* actuaría de forma dependiente de la luz para regular la transcripción de *CO*. Esta regulación tendría lugar de

forma indirecta, ya que FKF1 está implicado en la degradación durante la tarde de CDF1, un factor de transcripción tipo Dof que funciona como represor de CO, uniéndose directamente a su región promotora (Imaizumi et al., 2005). Recientemente se ha propuesto que FKF1 y GI forman un complejo dependiente de luz azul, necesario para medir la duración del día (Sawa et al., 2007). FKF1 puede absorber luz azul (Imaizumi et al., 2003) y existen evidencias de que las proteínas GI, FKF1 y CDF1 se asocian con la cromatina del gen CO (Sawa et al., 2007); por lo tanto, el complejo FKF1-GI actuaría sobre el promotor de CO regulando su expresión al final del día y proveyendo un mecanismo por el cual la coincidencia de la luz con el ritmo circadiano regularía la inducción fotoperiódica de la floración.

ELF3 y RFI2 también participan en la regulación transcripcional de CO. Así, en el mutante de floración temprana *elf3*, los niveles de expresión de *FKF1* y *GI* son mayores durante el día y en consecuencia aumenta la expresión de CO (Suárez-López et al., 2001; Kim et al., 2005a). También el mutante de floración temprana *rfi2* presenta un mayor nivel de expresión de CO, aunque al final de la noche (Chen y Ni, 2006a), justo en el momento en el que se observa una mayor transcripción de *RFI2*, que codifica una proteína que podría estar implicada en mecanismos de degradación de proteínas. Además, tanto *ELF3* (Liu et al. 2001) como *RFI2* (Chen y Ni, 2006b) podrían tener funciones adicionales en la regulación postranscripcional de la proteína CO, ya que afectan a las señales provenientes de PHYB, que a su vez afectan parcialmente a la actividad y a la estabilidad de la proteína CO.

La estabilidad de la proteína CO es mayor al final de la tarde en condiciones de DL y parece estar regulada por las señales procedentes de la luz, que son percibidas por los fotorreceptores PHYA, PHYB, CRY1 y CRY2 (Valverde et al. 2004). Por lo tanto, las distintas calidades de luz tienen un efecto diferente sobre la estabilidad de CO. Así, se ha podido demostrar que la luz roja promueve la degradación de CO en un proceso mediado por PHYB. Por su parte, la luz azul y la luz roja lejana inhiben la degradación de CO a través de PHYA y CRY2, manteniendo altos los niveles de CO e induciendo la floración (Valverde et al., 2004; Jang et al., 2008). En base a estas observaciones, se puede concluir que es la interacción de la luz y el mecanismo oscilador endógeno del reloj circadiano lo que regula la expresión de CO, modulando su actividad y permitiendo a la planta percibir la duración del día, e iniciar el proceso de floración en la estación más adecuada (Jang et al., 2008). Por otro lado, en condiciones de DC la proteína CO es inestable a lo largo del día (Valverde et al. 2004). Existen datos que apuntan a que el regulador negativo de la señalización mediada por PHYA, *SUPPRESSOR OF PHYA-1* (*SPA1*) y sus homólogos, *SPA3* y *SPA4*, participan en la regulación de la estabilidad de CO en estas condiciones de fotoperiodo (Ishikawa et al., 2006; Laubinger et al., 2006). El mutante *spa1* presenta un fenotipo de floración temprano en DC pero no en DL y muestra una relación genética sinérgica con *spa3* y *spa4* (Laubinger et al., 2006); además los niveles expresión de *FT* se incrementan en DC en el triple mutante *spa1 spa3 spa4*, incluso en los periodos de oscuridad (Ishikawa et al., 2006; Laubinger et al., 2006), lo que pone de relieve

que *SPA1* podría desempeñar un papel crucial en la activación dependiente de la luz o en la represión dependiente de oscuridad de la proteína CO. En este sentido, la proteína SPA1 interacciona “*in vitro*” con CO y se ha comprobado que CO es más estable en el triple mutante *spa1 spa3 spa4* (Laubinger et al., 2006). SPA1 también interacciona con COP1, una E3 ubiquitin-ligasa portadora de un dominio RING-finger que regula la estabilidad de varios factores de transcripción (Hoecker y Quail, 2001; Saijo et al., 2003; Seo et al., 2003; Yang et al., 2005; Datta et al., 2006). Dianas descritas de COP1 incluyen tanto a CO (Liu et al., 2008a), como a CONSTANS LIKE 3 (COL3), homólogo de CO (Datta et al. 2006); recientemente se ha descrito que COP1 interacciona físicamente con CO ubiquitinándolo y reduciendo sus niveles en oscuridad (Jang et al., 2008; Liu et al., 2008a); por el contrario, en presencia de luz, los criptocromos regulan negativamente a COP1, estabilizando a CO e induciendo la floración (Liu et al., 2008a). Así, en la oscuridad no se acumula la proteína CO, ya que es rápidamente degradada, y sólo en DL, cuando la transcripción de CO coincide con el periodo de luz, la proteína se acumula a un nivel capaz de activar la expresión de *FT* (Jang et al., 2008). En cambio, en DC no existe coincidencia entre la luz y el pico de expresión de CO y por tanto, el nivel de expresión de *FT* no aumenta, retrasándose el inicio de la floración (Valverde et al., 2004). En conclusión, tanto la regulación transcripcional de CO como la regulación postraduccional de la proteína CO podrían posibilitar a las plantas la selección de la estación más favorable para que tenga lugar una floración exitosa.

4. Regulación de la expresión del represor floral *FLC*.

Como ya se ha comentado anteriormente, los análisis realizados sobre el tiempo de floración de las distintas accesiones naturales de *Arabidopsis* permitieron identificar a los loci *FRI* y *FLC* como responsables principales de las respuestas a vernalización presentes en las mismas (Napp-Zinn, 1957; Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon et al., 1999; Johanson et al., 2000). *FLC* codifica un factor de transcripción de la familia MADS-box que actúa como represor floral. Este gen está sometido a una compleja regulación transcripcional, y está reprimido por la ruta de la vernalización y también por la ruta autónoma (Henderson et al. 2003; Henderson y Dean, 2004); además, se han descrito un número considerable de reguladores positivos y negativos de este gen (Simpson, 2004; He y Amasino, 2005; Quesada et al., 2005; Sung y Amasino, 2006; Schmitz y Amasino, 2007; Lázaro et al., 2008), que describiremos en las siguientes secciones.

4.1. La ruta autónoma de la floración.

Mutagénesis llevadas a cabo en accesiones de ciclo rápido como Ler y Col permitieron obtener mutaciones que restablecían la capacidad de respuesta a vernalización (Koornneef et al., 1991). De esta manera se propuso la ruta de promoción de la floración denominada autónoma, ya que los productos correspondientes de los genes silvestres parecían promover la floración independientemente del fotoperiodo. Loci adscritos a esta ruta son *FVE* (*AtMSI4*),

FLOWERING LOCUS D (FLD), *SWP1*, *RELATIVE OF EARLY FLOWERING6 (REF6)*, *SHK1-BINDING PROTEIN 1 (SKB1)*, *FCA*, *FPA*, *FY*, *FLOWERING LATE KH MOTIF (FLK)* y *LUMINIDEPENDENS (LD)* (revisado por Bäurle y Dean, 2006, Schmitz y Amasino, 2007). Las plantas con mutaciones en estos genes presentan un fenotipo de floración tardía en cualquier condición de fotoperiodo, que a diferencia de las mutaciones que afectan a genes de la ruta de fotoperiodo, se pueden rescatar por tratamientos de vernalización (Martínez-Zapater y Somerville, 1990; Koornneef et al., 1991; Lee et al., 1994; Chou y Yan, 1998; Michaels y Amasino, 1999a; Lee et al., 2000; Sheldon et al., 1999; Michaels y Amasino, 2000; Sheldon et al., 2000; Michaels y Amasino, 2001; Sung y Amasino, 2006). Además, mutaciones en los genes de la ruta autónoma promueven el aumento de la expresión de *FLC*, que a su vez es el represor clave que media la respuesta a vernalización (Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon et al., 1999). Aunque los genes implicados en esta ruta se han clonado en los últimos años, es ahora cuando se está empezando a comprender cómo reprimen la expresión de *FLC*; así, su posible función molecular sugiere la existencia de distintos mecanismos de regulación transcripcional y postranscripcional de este represor central en el control del tiempo de floración. La organización de la cromatina de *FLC* juega un papel fundamental en los mecanismos de represión transcripcional de este gen y mutaciones en loci tales como *FVE*, *FLD*, *SWP1/LDL1* y *REF6*, se han correlacionado con la hiperacetilación de la colas de las histonas H3 y H4 presentes en el locus *FLC*, lo que está de acuerdo con la mayor expresión de este gen observada en dichos mutantes (He et al., 2003; Ausín et al., 2004; Noh et al., 2004; Krichevsky et al., 2007). *FVE* codifica una proteína homóloga a las proteínas de levaduras MSI y a proteínas de mamíferos asociadas al retinoblastoma tales como RbAp46 y RbAp48, que participan en complejos de deacetilación de histonas (HDAC) (Ausín et al., 2004; Kim et al., 2004). *FLD* y *SWP1* codifican amino-oxidasas (He et al., 2003; Jiang et al., 2007; Krichevsky et al., 2007), homólogas a la proteína humana LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE1 (LSD1/AOF2) (Lee et al., 2006) que participa en procesos de demetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4) (Jiang et al., 2007; Liu et al., 2007a), mientras que *REF6* codifica una proteína homóloga a las de la familia jumonji de metazoos, que también participan en procesos de demetilación de histonas (Noh et al., 2004; Shi et al., 2004; Tsukada et al., 2006). Por su parte, *SKB1* es un homólogo de una metilasa de arginina de humanos (PRMT5) que cataliza la dimetilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3sme2) y se une al promotor de *FLC* (Pei et al., 2007; Wang et al., 2007a; Schmitz et al., 2008). Los mutantes de pérdida de función *skb1* presentan un aumento de la expresión de *FLC*, causante del fenotipo de floración tardía. Además, los mutantes *skb1* muestran una disminución de H4R3sme2 en las regiones reguladoras de *FLC*, lo que sugiere que esta modificación covalente es también requerida para la inducción de floración mediada por la represión de *FLC* (Wang et al., 2007a). Igualmente se ha descrito que las mutaciones en *PRMT10*, un gen que codifica otra metilasa de argininas, dan también lugar a fenotipos de floración tardía, debido al aumento de la expresión de *FLC* (Niu et al., 2007), sin embargo la función represora de este gen es independiente de la de *SKB1/PRMT5*. Se han descrito además, otros tipos de PRMTs tales como PRMT4a y PRMT4b

que median la metilación asimétrica de la arginina 17 de la histona H3 (H3R17ame2) y que actúan de forma redundante reprimiendo la expresión de *FLC* (Niu et al., 2008).

Por otro lado, los loci *FCA*, *FPA*, *FLK* y *FY*, contienen dominios implicados en la unión o en el metabolismo del RNA (Macknight et al., 1997; Schomburg et al., 2001; Lim et al., 2004; Mockler et al., 2004; Bäurle y Dean, 2006). *FY* es homólogo a un factor esencial de levaduras implicado en la poliadenilación y el procesamiento 3'-terminal de mensajeros (Simpson et al., 2003) y se ha demostrado que interacciona físicamente con *FCA* (Simpson et al., 2003; Bäurle y Dean, 2006). *FCA* regula negativamente su propia expresión de una forma dependiente de *FY* (Macknight et al., 2002; Quesada et al., 2003). Recientemente en *Arabidopsis* se ha identificado otro homólogo a un factor de poliadenilación de levaduras, PCF11P-SIMILAR PROTEIN 4 (PCFS4), que regula positivamente a *FCA* promoviendo la floración (Xing et al., 2008). Así, el mutante de floración tardía *pcfs4* posee un perfil de mensajeros de *FCA* alterado y presenta niveles elevados de *FLC* en cualquier condición de fotoperiodo. Los análisis bioquímicos indican que PCFS4 forma un complejo con *FY* y otros factores de poliadenilación “*in vivo*” (Xing et al., 2008). Por su parte, *FLK* podría interaccionar con *FCA/FY* y afectar al procesamiento y/o poliadenilación de genes aún no identificados. Estas observaciones evidenciarían que una batería de distintas proteínas de unión a RNA están implicadas en la regulación post-transcripcional del tiempo de floración en *Arabidopsis* (Lim et al., 2004), pero por el momento no existen pruebas directas que apoyen este modelo. Curiosamente, observaciones recientes indican que la proteína *FPA* se localiza en la cromatina de *FLC* y que *FCA* y *FPA* son necesarios para el silenciamiento de la cromatina de otros loci, mediado por un mecanismo que involucra a RNAi (Bäurle et al., 2007). Finalmente *LD* es una proteína nuclear que presenta dominios con secuencias consenso repetidas (Dingwall y Laskey, 1991) y una región rica en glutaminas en su extremo carboxilo-terminal, similar a los dominios encontrados en algunos factores transcripcionales (Mitchell y Tjian, 1989; Lee et al., 1994; Aukerman et al., 1999).

Hasta el momento las investigaciones realizadas con los genes de la ruta autónoma se han centrado principalmente en el papel que estos desempeñan en la regulación del tiempo de floración, ya que la pérdida de función de la mayoría estos genes tienen pocos fenotipos visibles aparte del fenotipo de floración tardía. Sin embargo, mientras que la pérdida parcial de función de *FY* provoca un fenotipo de floración tardía, la pérdida total de función de este locus causa letalidad embrionaria (Henderson et al., 2005). Por otro lado, el análisis de dobles mutantes entre *fpa* y otros mutantes de la ruta autónoma indica que aunque el fenotipo de floración tardía de algunos de los mutantes de la ruta autónoma solo se elimina por la pérdida de función de *FLC*, algunos de estos genes actúan de forma redundante para promover la floración a través de mecanismos independientes de *FLC* (Veley y Michaels, 2008). Además, dobles mutantes tales como *fpa fld*, *fpa fve* y *fpa ld* muestran un conjunto similar de fenotipos pleiotrópicos que indican que algunos de los genes de la ruta autónoma también poseen

funciones redundantes en el control de otros aspectos del crecimiento y desarrollo, además del tiempo de floración (Veley y Michaels, 2008). Esta redundancia funcional entre los mutantes de la ruta autónoma se basa en análisis transcriptómicos que han revelado que la mayoría de estos genes son necesarios para reprimir la expresión de elementos móviles que se sobre-expresan en los mutantes *fca* y *fpa* (Bäurle et al., 2007). Estos datos en conjunto aportan nueva información sobre la función de los genes de la ruta autónoma tanto en la regulación del tiempo de floración, como en otros aspectos del desarrollo.

4.2. La ruta de la vernalización.

Uno de los rasgos distintivos de la vernalización es la disociación entre el estímulo y el efecto (Chouard, 1960). Esta separación es temporal, ya que transcurren varios meses desde el inicio de la vernalización hasta que tiene lugar la respuesta a nivel de floración y de desarrollo, e incluso las semillas pueden vernalizarse y conservar el estado vernalizado durante todo el desarrollo hasta la fase adulta. Aunque muchos de los aspectos fisiológicos de la vernalización son todavía difíciles de comprender, en los últimos años se ha logrado un importante avance en descifrar las bases moleculares subyacentes a este mecanismo(s) de memoria celular. Como se comentó anteriormente en *Arabidopsis*, el requerimiento de vernalización es mayoritariamente otorgado por *FLC* (Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon et al., 1999), el cual se encuentra transcripcionalmente activado por *FRI* en la mayoría de las accesiones que requieren vernalización para florecer (Napp-Zinn, 1957; Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon et al., 1999; Johanson et al., 2000). *FLC* se expresa en diferentes órganos así como en los meristemas y en los tejidos vasculares, y actúa tanto a nivel de las hojas como en el meristemo apical para reprimir a los integradores florales *FT* y *SOC1* (Helliwell et al., 2006; Searle et al., 2006). La vernalización reprime fuertemente la expresión de *FLC* a través de una serie de modificaciones esenciales de las histonas que afectan el estado de la cromatina del locus *FLC* (He y Amasino 2005; Sung y Amasino 2005; Schmitz y Amasino, 2007) y este efecto invalida otros tipos de regulación, como los llevados a cabo por la ruta autónoma. De esta forma, una vez que la planta ha sido vernalizada, la represión del *FLC* es estable durante el resto del ciclo de vida de la planta y los niveles altos de expresión de *FLC* sólo se restablecen en la siguiente generación (revisado por Schmitz y Amasino, 2007; Sheldon et al., 2008). Gran parte del conocimiento sobre las bases moleculares de la vernalización proceden de los estudios realizados sobre la regulación de *FLC*; sin embargo, debe existir una respuesta de vernalización que es independiente de este represor de la transición floral, ya que plantas portadoras de alelos nulos de *FLC* siguen siendo sensibles a la vernalización (Michaels y Amasino, 2001; Moon et al., 2005). En los alelos nulos de *FLC*, tanto *FT* como *SOC1* aumentan su expresión tras la vernalización, lo que sugiere que la vernalización dependiente e independiente de *FLC* deben compartir las mismas dianas (Moon et al., 2005).

El mecanismo de represión de *FLC* que acontece durante la vernalización se ha estudiado ampliamente y se ha podido determinar que en primer término se produce una disminución de

las marcas epigenéticas de las histonas H3 y H4, asociadas a la activación del locus *FLC*, tales como la acetilación de las mismas o la trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3; Sung y Amasino, 2004; Sung et al., 2006a); además, varios trabajos han demostrado que tras la vernalización se incrementan los niveles de marcas represivas tales como la trimetilación de H3K9 y H3K27 del locus *FLC* (Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004; Shindo et al., 2006; Sung et al., 2006b; Finnegan y Dennis, 2007; Greb et al., 2007; De Lucia et al., 2008) y recientemente también se ha vinculado con el incremento de otra marca represiva como es la dimetilación de la histona H4 del locus *FLC* en residuos de arginina (H4R3sme2; Schmitz et al., 2008). Igualmente, durante la exposición a las temperaturas bajas se induce la expresión de un gen que codifica una proteína denominada VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3) (Sung y Amasino, 2004) que posee un dominio PHD característico de algunos factores remodeladores de la cromatina (Bienz, 2006). *VIN3* sólo se expresa a bajas temperaturas y aumenta gradualmente con el tiempo de exposición al frío, de tal forma que una vez que está presente la cantidad suficiente de proteína VIN3, la señal del frío se transmite en forma de modificaciones de la cromatina del locus *FLC*. Así, a diferencia de lo que ocurre en plantas silvestres, tras la vernalización del mutante *vin3* se observan niveles elevados de marcas epigenéticas activadoras en la cromatina de *FLC*, tales como la acetilación de histona H3, y no aumenta el nivel de marcas represivas tales como la trimetilación en H3K9 (H3K9me3) y H3K27 (H3K27me3) (Sung y Amasino, 2004). De esta forma se concluye que la actividad de la proteína VIN3 es necesaria para que se produzca la deacetilación del locus *FLC*, esencial para el establecimiento del silenciamiento de este gen tras la vernalización (Gendall et al., 2001; Bastow et al., 2004).

Por otro lado, a diferencia de los mutantes *vin3*, insensibles a los tratamientos de vernalización (revisado en Schmitz y Amasino, 2007), los mutantes *vrn1*, *vrn2* y *vrn5* se identificaron como mutaciones que reducían la respuesta a vernalización del mutante *fca* (Gendall et al., 2001; Levy et al., 2002; Greb et al., 2007). Se ha demostrado que en este proceso se requieren determinados factores homólogos al complejo POLYCOMB-GROUP REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2) de *Drosophila*, tales como VERNALIZATION 2 (VRN2), factores de transcripción con dominios B3, como VRN1, y factores homólogos a VIN3, tales como VRN5/VIL1 y VEL1 (Wood et al., 2006; De Lucia et al., 2008). Sin embargo, la secuencia de acontecimientos que conducen a la represión de *FLC* no está clara; si bien se había demostrado que VRN2, una proteína homóloga a Su(z)12 de *Drosophila*, era necesaria para el mantenimiento epigenético del estado silenciado de *FLC* tras la vernalización (Gendall et al., 2001; Bastow et al., 2004), recientemente se ha comprobado que VRN2 se asocia al locus *FLC* independientemente del frío, postulándose que su papel sería el de reclutar factores que medien la represión de *FLC* tras la vernalización (De Lucia et al., 2008). De esta manera, el silenciamiento inducido por la vernalización dependería de la asociación de VRN5 a una región concreta del locus *FLC* y de forma dependiente de la inducción de la proteína VIN3 (De Lucia et al., 2008). Así, en las plantas que ya han sido vernalizadas se observa una distribución más

amplia de VRN5 sobre el locus *FLC*, que aunque coincide con el aumento de H3K27me₃, parece no ser la única responsable de la aparición de esta marca epigenética (De Lucia et al., 2008).

Los componentes de los complejos PRC2 se encuentran conservados entre las plantas y los animales, y tienen una actividad histona metiltransferasa H3K27me₃ sobre los genes diana (Köhler y Villar, 2008); así por ejemplo en *Drosophila* el complejo ESC/E(Z) es capaz de metilar el residuo H3K27 gracias al dominio SET de la proteína E(Z) (revisado por Schwartz y Pirrotta, 2007). En este sentido, la purificación del complejo VRN5 después del tratamiento de vernalización confirma la existencia de un complejo PRC2-like compuesto por VRN2, SWINGER (SWN; homólogo a E(Z)), FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE; homólogo a ESC), MSI1 (homólogo a P55 de CAF-1) y tres proteínas PHD, como son VRN5, VIN3, y VRN5/VIN3-like 1 (VEL1) (De Lucia et al., 2008). De igual manera, se han propuesto complejos PRC2-like similares, compuestos al menos por las subunidades VRN2, SWN, EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2), FIE, CURLY LEAF (CLF; homólogo a E(Z)), y VIN3 (Wood et al. 2006; Jiang et al., 2008). Así por ejemplo, CLF media la deposición de la señal H3K27me₃ en la cromatina de los loci *FLC*, *MAF4*, *MAF5* y de los genes homeóticos *AGAMOUS* (AG) y *STM*, reprimiendo su expresión durante el desarrollo vegetativo (Jiang et al., 2008).

En *Drosophila* las marcas epigenéticas generadas por el complejo PRC2 son reconocidas por represores transcripcionales que forman parte del complejo PRC1 (Köhler y Villar, 2008). En *Arabidopsis*, esta marca epigenética probablemente sea una señal para que otros represores tales como TERMINAL FLOWER 2/LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (TFL2/LHP1) se unan al locus diana y en conjunto ayuden al mantenimiento estable de un estado silenciado (Levy et al., 2002; Mylne et al., 2006; Sung et al., 2006a; Turck et al., 2007). El mutante *tfl2* de *Arabidopsis* presenta una serie de alteraciones en el desarrollo tales como floración temprana, una menor estabilidad del estado vernalizado, la conversión del meristemo apical en una flor terminal, hojas rizadas y un menor crecimiento de las raíces (Larsson et al., 1998; Gaudin et al., 2001; Kotake et al., 2003). TFL2/LHP1 es homóloga a la proteína HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (HP1) de animales (Gaudin et al., 2001; Kotake et al., 2003), que está implicada en el reconocimiento de la marca H3K9me₃, contribuyendo así a la formación y al mantenimiento de la heterocromatina (Eissenberg y Elgin, 2000; Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Sin embargo, trabajos recientes han puesto de manifiesto que a diferencia de lo que ocurre en animales, en *Arabidopsis* TFL2/LHP1 está implicada en la represión de genes eucromáticos y además colocaliza con la señal epigenética H3K27me₃ (Turck et al., 2007). Por ello se ha sugerido que TFL2 podría desempeñar un papel similar al complejo PRC1 de animales. De hecho, recientemente se ha comprobado que TFL2/LHP1 se une a homólogos de dos factores del complejo PRC1 de animales, AtRING1a y AtRING1b, que a su vez se unen a CLF (Xu y Shen, 2008). Mutaciones en estos dos factores son sinérgicas con las mutaciones *clf* o *tfl2* y provocan expresión ectópica de genes *KNOX*. Así, se ha

propuesto que AtRING1a, AtRING1b y TFL2/LHP1 formen un complejo PRC1-like que reconocería las marcas H3K27me3 depositadas por el complejo PRC2-CLF (Xu y Shen, 2008). Por otro lado, era conocido que la vernalización requiere de la actividad mitótica (Wellensiek, 1962, 1964) y recientemente se ha sugerido que tanto la marca H3K27me3 de *FLC* como la represión de este locus no pueden mantenerse eficientemente en tejidos que no se dividen (Finnegan y Dennis, 2007).

4.3. Otros represores de la actividad de *FLC*.

Se han descrito distintos represores de la actividad de *FLC* que no han sido aún incluidos en ninguna de las rutas anteriormente descritas; así por ejemplo, el mutante *hac1* presenta un retraso en la floración como consecuencia de una mayor expresión de *FLC*, pero no se observa modificación de la cromatina de *FLC* ni de los niveles de expresión de los genes de la ruta autónoma (Deng et al., 2007). *HAC1* codifica una histona acetiltransferasa de *Arabidopsis* homóloga a la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc p300/CREB de animales y se postula que podría estar implicada en la modificación de la cromatina de factores situados aguas arriba de *FLC* (Deng et al., 2007). Por su parte, mutaciones en *HDA6*, un gen que codifica una histona deacetilasa tipo RPD3, provocan fenotipos de floración tardía debidos al aumento de la expresión de *FLC* (Wu et al., 2008). Así, el mutante *hda6* contiene mayores niveles de acetilación en la cromatina de *FLC*, lo que sugiere que HDA6 es necesario para deacetilar la cromatina y reprimir la expresión de *FLC* (Wu et al., 2008). Se han descrito además otras mutaciones que potencian los fenotipos tardíos de los mutantes de la ruta autónoma; por ejemplo, la mutación *brassinosteroid-insensitive 1 (bri1)* potencia el fenotipo del mutante *ld* (Domagalska et al., 2007) y en el doble mutante *bri1 ld* se observan mayores niveles de acetilación en la histona H3 de *FLC* que en el mutante *ld*, por lo que la ruta de señalización procedente de los brasinoesteroides podría mediar en la represión de *FLC* (Domagalska et al., 2007).

Por otro lado, se han descrito siRNAs de 30 y 24 nucleótidos complementarios al mensajero de *FLC* (Swiezewski et al., 2007). Su presencia depende de la RNA polimerasa IV y las mutaciones de las regiones codificantes de estos siRNAs dan lugar a fenotipos de floración tardía como consecuencia de una mayor expresión de *FLC*. Además, las proteínas DICER-LIKE-1 (DCL1) y DCL3 participan en la generación de estos RNAs y los dobles mutantes en los genes que las codifican también presentan un fenotipo de floración tardía, debido al aumento de la expresión de *FLC* (Swiezewski et al., 2007). Los siRNAs están implicados además en el inicio y el mantenimiento del silenciamiento génico a través de la metilación del DNA y/o metilación de histonas de diferentes loci; en este sentido se ha observado que el triple mutante *dcl2 dcl3 dcl4* contiene en la región genómica de *FLC* niveles reducidos de la marca represiva H3K9me2 (Swiezewski et al., 2007), lo que sugiere que la remodelación de la cromatina mediada por siRNA está implicada en la represión de la expresión de *FLC*.

4.4. Reguladores positivos de la actividad de *FLC*.

A diferencia de lo observado en mutantes de la ruta autónoma, que presentan un aumento de los niveles de *FLC* (Bäurle y Dean, 2006), el estudio de mutantes tempranos de las variedades anuales de invierno con alelos activos de *FRI*, ha llevado a la identificación de varios loci que se requieren para la expresión de *FLC*. Así, *FRIGIDA-LIKE1* (*FRL1*) y *FRIGIDA ESSENTIAL1* (*FES1*) han sido identificados como genes que se requieren para la activación de la expresión de *FLC* por *FRI* (Michaels et al., 2004; Schmitz et al., 2005). *FRL1* es similar a *FRI* y codifica una proteína con un dominio tipo Coiled-Coil, mientras que *FES1* codifica una proteína con un dedo de zinc tipo CCCH, por lo que ambos factores podrían estar implicados en interacciones entre proteínas. Los mutantes *frl1* y *fes1* presentan un fenotipo de floración temprana y no son capaces de suprimir el fenotipo de floración tardía de los mutantes de la ruta autónoma, por lo que la función de estos dos genes depende exclusivamente de *FRI* (Schmitz et al., 2005). Debido a que los tres mutantes, *fri*, *frl1*, y *fes1* muestran el mismo fenotipo, es posible que los tres genes cooperen promoviendo la expresión de *FLC*. Sin embargo, su función molecular aún se desconoce. De igual manera, las mutaciones en *SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4* (*SUF4*) presentan fenotipos de floración similares a *fri* (Kim et al., 2006; Kim y Michaels, 2006). *SUF4* codifica una proteína de localización nuclear con un dedo de zinc del tipo C2H2 y se une al promotor de *FLC* in vivo (Kim et al., 2006). Además la proteína *SUF4* se une a *FRI* y *FRL1*, lo que sugiere la formación de un complejo que actuaría como un activador transcripcional de *FLC*. También se ha demostrado que cuando *FRI* está ausente, *LD* se une a *SUF4* y suprime su actividad (Kim et al., 2006).

Otros loci que se han aislado mediante estrategias similares son los homólogos de los componentes del complejo RNA POLYMERASE ASSOCIATED FACTOR 1 (PAF1) de levaduras (Oh et al., 2004; He et al., 2004; Oh et al., 2008). Mutaciones en cualquiera de los homólogos del complejo PAF1 causan una supresión de la expresión de *FLC* y por lo tanto, originan fenotipos de floración temprana en las variedades anuales de invierno y en los mutantes de la ruta autónoma. Así, se ha podido determinar que *VIP4*, *VIP5*, *ELF7* y *ELF8* son necesarios para la trimetilación de H3K4 de la región promotora de *FLC* (Squazzo et al. 2002; Krogan et al. 2003; Ng et al. 2003; He et al., 2004), que como hemos comentado anteriormente, es una marca epigenética distintiva de un estado activo de la cromatina. Algo similar se observa en las mutaciones para el gen *EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS* (*EFS*), que codifica un ortólogo de SET1, una proteína metil transferasa de H3 que se asocia al complejo Paf1 de levaduras (Soppe et al., 1999; Kim et al., 2005b). El mutante *efs* posee niveles reducidos de H3K4me3 o de H3K36me2 en la cromatina de *FLC* (Kim et al., 2005b; Zhao et al., 2005). Por ello se ha propuesto que los componentes del complejo PAF probablemente recluten a otros efectores tales como *EFS* para llevar a cabo su función en la modificación de la cromatina de *FLC* y de otros loci (He y Amasino, 2005; Oh et al., 2008). De la misma manera, se ha comprobado que los mutantes *suf4* y *frl1*, en presencia de un alelo

funcional de *FRI*, poseen menores niveles de H3K4me3 del locus *FLC*, por lo que cabe la posibilidad de que estos factores intervengan también en el establecimiento de esta marca epigenética (Kim y Michaels, 2006). Existen otros reguladores positivos de la actividad de *FLC* que a su vez forman parte de complejos remodeladores de la cromatina que regulan transcripcionalmente la actividad de varios genes de desarrollo (Pien y Grossniklaus, 2007). Es el caso de genes tales como *TRITHORAX1* (*ATX1*), que es necesario para la regulación de la expresión de *FLC* (Pien et al., 2008). Al igual que EFS, *ATX1* contiene en su secuencia un dominio de unión a histonas tipo *SET1*, y posee actividad histona metil-transferasa que trimetila específicamente la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3). Se ha propuesto que *ATX1* se une directamente a la cromatina de *FLC* antes de que se produzca la floración, liberándose durante la transición floral (Pien et al., 2008).

Complejos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP, homólogos a los descritos en levaduras y en otros organismos, también están implicados en la regulación de la expresión de *FLC* en *Arabidopsis* (revisado por Reyes, 2006). Así se ha descrito que mutantes de pérdida de función para homólogos de componentes del complejo SWR1 (SWR1C) de levaduras, presentan un fenotipo de floración temprana (Noh y Amasino, 2003; Kandasamy et al., 2005; Choi et al., 2005; Deal et al. 2005; Martín-Trillo et al., 2006; Choi et al 2007; March-Díaz et al., 2007; Lázaro et al., 2008). La función bioquímica del complejo SWR1C de levaduras es la de catalizar la sustitución de la histona H2A por la variante H2AZ (Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004). La deposición de la histona H2AZ es necesaria para la regulación transcripcional a nivel de la heterocromatina y para la estabilidad en el genoma de las levaduras (revisado por Kamakaka y Biggins, 2005). En cuanto a la regulación transcripcional, el complejo SWR1C de levaduras deposita la variante H2AZ en el sitio de inicio transcripcional de un gran número de genes (Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005). En levaduras este complejo consta de 13 subunidades, existiendo homólogos para la mayoría de ellos en *Arabidopsis* (Meagher et al., 2005). Así, *PHOTOPERIOD INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1* (*PIE1*) codifica un homólogo de la subunidad catalítica SWR1, que contiene un dominio SANT presente en los miembros de la familia ISWI (Noh y Amasino, 2003). Otros homólogos ya identificados de componentes del complejo SWR1C son *ACTIN-RELATED PROTEIN 4* (*AtARP4*), *SUPRESOR OF FRIGIDA 3/EARLY IN SHORT DAYS 1/ACTIN-RELATED PROTEIN 6* (*SUF3/ESD1/AtARP6*) y *AtSWC6* (Kandasamy et al., 2005; Choi et al., 2005; Deal et al. 2005; Martín-Trillo et al., 2006; Choi et al 2007; Lázaro et al., 2008). Mutaciones en estos homólogos causan un fenotipo de floración temprana por reducción de la expresión de *FLC*. Por otra parte, los mutantes *pie1*, *suf3* y *swc6* presentan los mismos defectos de desarrollo, incluyendo floración temprana, hojas aserradas, presencia de extra-pétalos y menor dominancia apical. Se ha demostrado que tanto *AtSWC6* como *SUF3* colocalizan y se unen a la región promotora de *FLC* (Choi et al., 2007; Lázaro et al., 2008). Además, experimentos *in vitro* muestran que *PIE1* interacciona con *SUF3*, *AtSWC6* y *H2A.Z* (Choi et al., 2007), y que *AtSWC6* interacciona con *SUF3/ESD1/AtARP6* (Choi et al., 2007;

Lázaro et al., 2008) y con AtSWC2, otro componente del complejo homólogo SWR1C (Choi et al., 2007). Por otro lado, existen tres homólogos en *Arabidopsis* de la variante histónica H2A.Z (Yi et al., 2006) y la combinación de las pérdidas parciales de función de estos provocan fenotipos similares a los observados en los mutantes de los componentes del complejo SWR1C de *Arabidopsis* (Choi et al., 2007).

Por ultimo, se han aislado reguladores positivos de la actividad de *FLC* a través de la identificación de mutantes afectados en mecanismos de modificación postraduccionales tales como la ubiquitinación/desubiquitinación o la sumolización/desumolización. Así, la pérdida de función de *UBIQUITIN CARRIER PROTEIN 1 (UBC1)* y *UBC2*, dos genes que codifican E3 ubiquitin ligasas (Cao et al., 2008; Gu et al., 2009; Xu et al., 2009), provoca un fenotipo de floración temprana que se ha asociado a la presencia de un nivel reducido de expresión de *FLC*. Por su parte, la pérdida de función de *HISTONE MONOUBIQUITINATION 1 (HUB1)* y *HUB2*, genes que codifican dos enzimas E2, también provoca fenotipos de floración temprana y reducción de los niveles de *FLC*. Además, se ha podido comprobar que tanto en el doble mutante *ubc1 ubc2* como en el mutante *hub2*, los niveles de histona H2B monoubiquitinada del locus *FLC* se reducen drásticamente y los análisis bioquímicos han demostrado que HUB1 y HUB2 interaccionan entre sí y con el complejo formado por UBC1 y UBC2 (Cao et al., 2008; Gu et al., 2009; Xu et al., 2009), lo que indica que la función de este complejo es la de marcar la histona H2B en la cromatina de *FLC* y activar su expresión. Asimismo, la pérdida de función del gen *UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE26 (UBP26)*, que codifica una histona H2B deubiquitinasa, provoca un fenotipo de floración temprana asociada también a la presencia de menores niveles de expresión de *FLC* (Schmitz et al., 2009). El mutante *ubp26* acumula en la región genómica de *FLC* niveles elevados de histona H2B monoubiquitinada, de histona H3K27 trimetilada y menores niveles de histona H3K36 trimetilada (Schmitz et al., 2009). Por lo tanto, la función de *UBP26* estaría de acuerdo con un modelo en el cual la deubiquitinación sería necesaria para que se produzca una acumulación suficiente de histona H3K36 trimetilada que permita una adecuada activación transcripcional del locus *FLC*. Por otro lado, recientemente se ha aislado SINAT5 una proteína con actividad E3 ubiquitin-ligasa que tiene a *FLC* como sustrato (Park et al., 2007); aunque por el momento no se dispone de un mutante de pérdida de función, se ha propuesto que SINAT5 participa en la estabilidad de la proteína *FLC* regulando así el tiempo de floración a través de su proteólisis.

Por otra parte, *EARLY IN SHORT DAYS4 (ESD4)* codifica una pequeña proteína con un alto grado de homología a un tipo de proteasas eucariotas específicas de SUMO (Murtas et al. 2003); el mutante *esd4* presenta un fenotipo de floración temprano muy acusado y alteraciones en el desarrollo del meristemo apical (Murtas et al. 2003). El fenotipo temprano de *esd4* en condiciones de DC se asocia con una baja expresión de *FLC* (Reeves et al., 2002; Murtas et al., 2003), y los análisis genéticos han revelado que *ESD4* funciona tanto aguas abajo como de forma paralela a *FLD* (Reeves et al., 2002).

5. Mecanismos de vernalización mediados por los genes *MAF* y otros genes de la familia MADS-box.

Como ya hemos introducido anteriormente, el hecho de que plantas portadoras de alelos nulos de *FLC* sigan respondiendo a los tratamientos de vernalización (Michaels y Amasino, 2001), indica que los tratamientos de vernalización promueven también la floración a través de mecanismos independientes de la represión ejercida sobre *FLC*. Además, la vernalización es una respuesta cuantitativa a los períodos prolongados de frío (Sheldon et al., 2000) y por lo tanto, debe existir algún mecanismo que garantice que la vernalización no se produzca en respuesta a períodos breves de frío (Ratcliffe et al. 2003). *FLC* es un miembro de una pequeña familia que contiene otras cinco proteínas MADS-box relacionadas, denominadas MADS AFFECTING FLOWERING 1-5 (*MAF1-5*), que presentan entre un 53-87% de identidad con *FLC* (De Bodt et al., 2003; Ratcliffe et al., 2003) y probablemente funcionen como represoras de la floración (Ratcliffe et al., 2003), si bien esta hipótesis necesita de más evidencias experimentales para ser corroborada.

FLM, también denominado *MAF1*, es un represor de la floración (Ratcliffe et al., 2001; Scortecci et al., 2001), y aunque no se ha propuesto un papel claro en vernalización para este gen, observaciones recientes apuntan a que la expresión de *MAF1* puede ser suprimida por vernalización (Sung et al., 2006b); por el contrario, la represión de su mensajero parece contribuir a la aceleración de la floración inducida por elevadas temperaturas de crecimiento (Werner et al., 2005; Li et al., 2006), tema sobre el que trataremos posteriormente. Además de los mutantes *flc* y *maf1/flm*, también se han caracterizado mutantes para el gen *MAF2* (Ratcliffe et al., 2003). Los mutantes *maf2* florecen ligeramente antes que la planta silvestre, pero aún conservan una respuesta normal a las 6 semanas de vernalización (Ratcliffe et al., 2003). Sin embargo, si las plantas *maf2* se exponen sólo 10 días a frío, tratamiento que no es suficiente para obtener una respuesta a vernalización en el tipo silvestre, se observa en ellas una aceleración significativa de la floración. De hecho, en los mutantes *maf2* un tratamiento de 21 días de frío puede acelerar la floración de forma similar a un tratamiento de 85 días en el tipo silvestre, lo que sugiere que *MAF2* podría regular el retraso en el establecimiento del estado vernalizado. Esta función específica podría impedir por ejemplo que unos pocos días de frío durante el otoño, desencadenen una floración precoz durante el invierno. Además, esta inducción de la floración por exposición a períodos cortos de baja temperatura, parece ser independiente de *FLC* ya que después de un tratamiento de 10 días, no se detectan disminuciones significativas de la expresión de *FLC* (Ratcliffe et al., 2003). Por otra parte, plantas *35S::MAF2* no responden a vernalización ya que existe una represión continua de *SOC1*, incluso cuando la expresión de *FLC* está reducida (Ratcliffe et al., 2003). En este sentido, aún no se ha establecido si *MAF3-5* también reprimen la expresión de *SOC1* y por lo tanto la floración, ya que además la sobre-expresión de estos genes parece ser muy

dependiente del fondo genético y no siempre provocan un fenotipo de floración tardía (Ratcliffe et al., 2003).

FLC y algunos genes de los genes *MAF* comparten varios genes reguladores, tales como *VIP5* y *ELF8/VIP6* (He et al., 2004; Oh et al., 2004) o *ESD1/ARP6* y *AtSWC6* (Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008). Además, plantas de *Arabidopsis* que muestran una reducción en los niveles de metilación del DNA tienen reducida la expresión de los loci *FLC* y *MAF1-5*, lo que sugiere que la metilación del DNA altera la expresión de un regulador en trans común a estos loci (Finnegan et al., 2005). Por el contrario, se han encontrado algunos reguladores que afectan sólo a un subconjunto de genes *FLC/MAF* (He et al., 2004; March-Díaz et al., 2007). Al igual que *FLC*, los genes *MAF* están regulados generalmente por la vernalización. Así, la vernalización reprime a *MAF1*, *MAF2* y *MAF3*, mientras que induce la expresión de *MAF5* y no afecta a la de *MAF4* (Ratcliffe et al., 2003; Sung et al., 2006b).

Aunque la marca epigenética H3K27me3 es esencial para reprimir *FLC* tras la vernalización, no está claro si está implicada en la regulación de los genes *MAF*. Los análisis sobre la distribución en el genoma de esta marca revelan que sólo *MAF4* y *MAF5* poseen niveles significativamente altos de H3K27me3 (Zhang et al., 2007). Sin embargo, a diferencia de lo observado para *FLC*, donde esta marca abarca toda la longitud del locus, parece ser que en los loci *MAF4* y *MAF5* sólo se sitúa en determinadas regiones (Zhang et al., 2007). Cabe señalar que este conjunto de datos a nivel global se basan en los análisis realizados en plántulas no vernalizadas y que el locus *FLC* contiene considerables cantidades de H3K27me3 incluso en estas condiciones (Zhang et al., 2007). No se puede descartar por lo tanto, que tras la vernalización, las marcas de H3K27me3 se acumulen también en los loci *MAF1-MAF3*, y que estén regulados por esta marca epigenética.

Otro regulador clave de la respuesta a la vernalización es el gen MADS-box *AGAMOUS LIKE 19* (*AGL19*) (Alexander y Hennig, 2008). *AGL19* posee un papel independiente de la función de *FLC*, ya que el doble mutante *agl19 flc* posee un fenotipo aditivo en respuesta a la vernalización y su nivel de expresión es independiente de *FLC* (Schönrock et al., 2006). Su sobre-expresión provoca un fenotipo de floración temprana y aunque actúe como un activador de la floración, comparte un mecanismo de regulación común con el represor *FLC*, ya que ambos están regulados a nivel de la cromatina por vernalización de forma dependiente de *VIN3*. De esta manera, el locus *AGL19* posee niveles altos de H3K27me3 que disminuyen considerablemente después de la vernalización (Schönrock et al., 2006). Así, mientras la expresión de *FLC* se silencia de forma permanentemente tras la vernalización, la expresión de *AGL19* está silenciada temporalmente antes de la exposición prolongada a bajas temperaturas. Por otro lado, se sabe que el silenciamiento de *FLC* por frío implica no sólo la represión mediada por la presencia de la marca H3K27me3, sino también por la presencia de marcas como H3K9me2 (Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004). Sin embargo, no se han

encontrado marcas H3K9me2 en la cromatina de *AGL19*. En plantas, la presencia de H3K9me2 suele estar relacionada con el silenciamiento estable que se produce en las zonas de heterocromatina, mientras que la presencia de H3K27me3 se relaciona con silenciamientos transitorios de la eucromatina (Fuchs et al., 2006); es posible por lo tanto que el silenciamiento estable de *FLC* implique marcas epigenéticas adicionales, que no sean necesarias para silenciar temporalmente la cromatina de *AGL19*.

6. *SVP* y su papel en la respuesta a los cambios de temperatura ambiente.

Otro regulador de la floración lo constituye *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) (Li et al., 2008). *SVP* codifica un factor de transcripción tipo MADS-box que actúa como un represor de la floración (Hartmann et al., 2000), de tal manera que los mutantes *svp* presentan un fenotipo de floración temprana (Hartmann et al., 2000). *SVP* está controlado por la ruta autónoma y por la ruta de las giberelinas (Lee et al., 2007a; Li et al., 2008), y el mutante *svp* es insensible a las fluctuaciones de temperatura cercanas a la temperatura normal de crecimiento, por lo que *SVP* podría desempeñar un papel importante en la respuesta a los cambios de temperatura ambiente, pero no en la respuesta al frío (Lee et al., 2007a). La mutación *svp* suprime casi totalmente el fenotipo tardío de floración de plantas con alelos funcionales de *FLC* y *FRI* (Lee et al., 2007a), lo que sugiere que *FLC* requeriría también de *SVP* para retrasar la floración. Teniendo en cuenta que las proteínas MADS-box interaccionan físicamente (Riechmann y Meyerowitz 1997), se ha propuesto una posible hipótesis que explique esta observación, de tal forma que *SVP* y *FLC* puedan interaccionar en un complejo de señalización dependiente de la temperatura ambiental (de Folter et al. 2005; Helliwell et al. 2006). Por otro lado, el mutante *svp* presenta elevados niveles de *FT* (Kardailsky et al. 1999; Kobayashi et al. 1999), tanto a 23°C como a 16°C, lo que indica que la vía de señalización dependiente de la temperatura funciona, al menos en parte, a través de *FT* (Blázquez et al. 2003; Halliday et al. 2003). Ensayos llevados a cabo con construcciones *FT::uidA* revelaron expresiones ectópicas del gen delator en las hojas, en los tejidos vasculares y en la raíz del mutante *svp* (Lee et al., 2007a). Además, tanto aproximaciones de inmunoprecipitación de cromatina como ensayos con diferentes versiones del promotor de *FT* dirigiendo la expresión del gen de la *LUCIFERASA* (*LUC*), indican que la zona vCARG III del promotor de *FT* es necesaria para que *SVP* medie la represión de este integrador floral (Li et al., 2008). *SVP* también reprime directamente la expresión de *SOC1* en el SAM y en la hoja (Li et al., 2008) y recientemente se ha podido comprobar que *SVP* comparte con *FLC* las mismas zonas de unión a los promotores de *SOC1* y *FT*. Así, durante el desarrollo vegetativo, *SVP* interacciona in vivo con *FLC* y su función es mutuamente dependiente (Li et al., 2008).

7. La ruta de las giberelinas.

Las giberelinas (GAs) son un tipo de hormonas reguladoras del crecimiento de plantas que afectan a muchos aspectos del desarrollo vegetal (Schwechheimer, 2008) y promueven la floración en varias plantas de DL, incluida *Arabidopsis* (Zeevaart, 1983; Bernier, 1988; Putterill et al., 1995). En particular, el tratamiento exógeno con GAs acelera la floración de *Arabidopsis* (Langridge, 1957; Chandler y Dean, 1994). Además, mutaciones que alteran la biosíntesis de GAs ó la transmisión de señales mediadas por esta hormona provocan alteraciones en el tiempo de floración (Wilson et al., 1992; Jacobsen y Olszewski, 1993). Así por ejemplo, el mutante *ga1-3* tiene una delección en el gen que codifica la enzima ENT-KAURENO SINTETASA A, que cataliza el primer paso en la biosíntesis de GAs (Koornneef y van der Veen, 1980; Sun y Kamiya, 1994). Este mutante posee niveles muy reducidos de GAs, no florece en condiciones de DC y muestra un ligero retraso de la floración en condiciones de DL (Wilson et al., 1992; Reeves y Coupland, 2001), indicando la necesidad de las GAs para la floración, fundamentalmente en condiciones de DC.

Las GAs actúan en parte, a través de la desestabilización de una familia de proteínas denominadas DELLA. En *Arabidopsis* se conocen 5 proteínas DELLA (Fleck y Harberd, 2002) y tres de ellas, GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) y RGA-LIKE1 (RGL1) (Koornneef, 1985; Wilson et al., 1992; Fleck y Harberd, 2002), están implicadas en la respuesta mediada por GAs. Así por ejemplo, el mutante *gai-1* posee un fenotipo de floración muy tardío en DC, que a diferencia del mutante *ga1-3*, no se recupera mediante el tratamiento exógeno con GAs (Wilson et al., 1992). Por otro lado, los análisis genéticos han demostrado que el fenotipo de floración tardío causado por la disminución de la biosíntesis del GAs presente en el mutante *ga1-3* se debe en parte a la represión activa de las señales mediadas por GAs por parte de GAI y RGA (King et al., 2001). Por el contrario, el mutante *spindly* (*spy*) posee una activación constitutiva de la señalización mediada por GAs y presenta un fenotipo de floración temprana tanto en DL como en DC (Jacobsen y Olszewski, 1993).

Se han estudiado las interacciones genéticas entre la ruta de las GAs y otras rutas de floración y se ha propuesto que esta ruta actúa con independencia de la ruta del fotoperiodo, ya que el fenotipo de floración de *ga1-3* es un poco más tardío que el del tipo silvestre en condiciones de DL y que el doble mutante *ga1 co* a menudo no florece en condiciones de DL (Putterill et al., 1995; Reeves y Coupland, 2001); se ha demostrado que las GAs activan la expresión de *LFY* a través de elementos en cis del promotor diferentes a los necesarios para activar este gen en respuesta a fotoperiodos inductivos, demostrándose que el promotor de *LFY* integra tanto las señales endógenas como las medioambientales que controlan el tiempo de floración (Blázquez y Weigel, 2000). Además, los análisis genéticos realizados con dobles y triples mutantes entre *co*, *ga1* y *fca* muestran que la ruta de las GAs influye sobre todo en la

floración en condiciones de DC (Reeves y Coupland, 2001) y por lo tanto el fenotipo de floración de este mutante se debería a la inactividad de ambas vías en estas condiciones de fotoperiodo (Koornneef y van der Veen, 1980; Koornneef et al., 1985, Wilson et al., 1992; Reeves y Coupland, 2001). De hecho se ha demostrado que *SOC1* es el responsable de integrar las señales provenientes de las GAs y activar la floración en condiciones de DC (Moon et al., 2003). Asimismo, se ha podido demostrar que ciertas alteraciones en la función del reloj circadiano, en concreto del regulador *TOC1*, afectan a la expresión de genes implicados en la biosíntesis de GAs, así como de los reguladores centrales de las respuestas fotoperiódicas de DL (Blázquez et al., 2002). Sin embargo, estas respuestas parecen darse en paralelo, ya que los efectos del control fotoperiódico de la floración son independientes de la señalización mediada por GAs. Por otro lado, se ha descartado que las GAs pudieran tener un papel en la vernalización (Wilson et al., 1992; Dennis et al., 1998), al demostrarse que tanto plantas *ga1-3 FRI FLC* como *ga1-3 fca-1* respondían a vernalización en condiciones de DL (Michaels y Amasino, 1999b; Chandler et al., 2000; Reeves y Coupland, 2001; Blázquez et al., 2002).

8. Aceleración de la floración de *Arabidopsis* bajo condiciones de estrés.

La floración de *Arabidopsis* es sensible a situaciones que originen estrés, de forma que ésta puede acelerarse bajo condiciones adversas, activando de forma prematura el programa de desarrollo reproductivo. Existen una gran variedad de factores de estrés capaces de promover la floración, tales como la disponibilidad de nutrientes, el metabolismo de algunos de aminoácidos y azúcares, la infección por patógenos, la sequía, las temperaturas extremas o la exposición a determinadas radiaciones solares. La disponibilidad de nutrientes como el fósforo es vital para el desarrollo de las plantas anuales, ya que una deficiencia de éste provoca retrasos en la floración y en el desarrollo (Nord y Lynch, 2008). Sin embargo, el efecto del déficit de otros nutrientes minerales en la floración de *Arabidopsis* provoca fenotipos tempranos, sobre todo en condiciones de DC (Kolár y Senková, 2008). La homeostasis de determinados osmolitos tales como azúcares, polialcoholes y aminoácidos, no sólo modula el potencial osmótico de las células (Chen y Murata, 2002), ayudando a mantener el contenido de agua en situaciones de estrés salino (Cushman, 2001; Serraj y Sinclair, 2002; Zhu, 2003; Bartels y Ramanjalu, 2005), sino que también regula diferentes procesos de desarrollo en las plantas, tales como la germinación de la semilla, la floración, la senescencia, así como la protección contra diversos estreses bióticos y abióticos. Por ejemplo, en el mutante de floración temprana *sweetie* se sobre-expresan genes implicados en el metabolismo de los azúcares, la senescencia, la biosíntesis de etileno y genes implicados en estrés abiótico y se acumulan niveles elevados de la trehalosa, trehalosa-6-fosfato y almidón (Veyres et al., 2008). De igual manera, los mutantes de pérdida de función de *AtP5CS1*, un gen que codifica una enzima limitante en la biosíntesis de prolina, poseen un fenotipo de floración tardía (Mattioli et al., 2008); por el contrario, la sobre-expresión de este gen provoca una acumulación de prolina que lleva asociado un fenotipo de floración temprana en cualquier condición de fotoperiodo (Mattioli et al., 2008).

Los efectos de la salinidad en el desarrollo de las plantas se asocia a una disminución del potencial hídrico del suelo y con el aumento de la toxicidad asociada una mayor absorción de Na^+ y Cl^- , o a una combinación de ambas; estas a su vez interfieren con la absorción de nutrientes esenciales que causan a menudo otros estreses secundarios, como el daño oxidativo (Zhu, 2001, Yamamoto et al., 2005, Shao et al., 2008). Cuando aparecen daños oxidativos se inducen determinados genes, como *NTM1-like 8 (NTL8)*, un gen que codifica un factor de transcripción de la familia NAC que está implicado en la regulación del tiempo de floración (Kim et al 2007a; Kim et al 2007b). *NTL8* se expresa como una proteína inactiva asociada a membrana, y una vez activada, se transloca al núcleo. La sobre-expresión de la forma activa provoca un fenotipo de floración tardía debida a una disminución de la expresión de *FT* y de genes regulados por este integrador floral (Kim et al 2007a). Además, se ha comprobado que la expresión de *FT* se reprime por estrés salino, por lo que *NTL8* podría regular la floración mediada por estrés salino a través de *FT*. Igualmente, el gen inducido por estrés osmótico *AtHAP3b* regula la expresión de *FT* (Chen et al., 2007). Así, las mutaciones *hap3b-1* y *hap3b-2* provocan un fenotipo de floración tardío en condiciones de DL. *AtHAP3b* codifica una proteína que forma parte del complejo HAP que, como ya comentamos, podría regular junto a CO la expresión de *FT*. Además, algunos genes regulados positivamente por NaCl y por el gen *TMAC2* se inducen también por ABA (Huang y Wu, 2007). *TMAC2* codifica una proteína nuclear con dominios de función desconocida y presenta un nivel elevado de expresión en las raíces. Su sobre-expresión provoca un fenotipo de floración tardía al disminuir la expresión de *SOC1* y de genes de identidad de meristemo floral como *SEPALLATA 3 (SEP3/AGL9)*; Huang y Wu, 2007).

Uno de los estreses ambientales que más afecta al tiempo de floración es la exposición al frío, si bien se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de la respuesta a bajas temperaturas sobre el tiempo de floración (Kim et al., 2004). El mutante *hos10*, afectado en una proteína MYB, presenta un fenotipo de floración temprana y es extremadamente sensible a la salinidad y a las temperaturas de congelación; de hecho, la mutación *hos10* provoca un aumento rápido de la expresión de genes implicados en la respuesta a bajas temperaturas y de otros genes implicados en la respuesta al estrés inducida por ABA y estrés salino, por lo que *HOS10* podría coordinar las respuestas de estrés abiótico y de desarrollo (Zhu et al., 2005). El gen *LONG VEGETATIVE PHASE 1 (LOV1)* también participa en el control de las respuestas a bajas temperaturas y en el control del tiempo de floración (Yoo et al., 2007). Así, tanto la ganancia como la pérdida de función de *LOV1* afectan el tiempo de floración exclusivamente en condiciones de DL, lo que sugiere que *LOV1* podría regular la ruta del fotoperíodo. De hecho, *LOV1* regula negativamente la expresión de CO, existiendo además una relación de epistasia entre ambos genes (Yoo et al., 2007). Por otro lado, la pérdida de función de *LOV1* provoca una hipersensibilidad a las temperaturas bajas, mientras que una ganancia de función confiere tolerancia al frío (Yoo et al., 2007). Asimismo,

se ha descrito que la expresión de *GI* se induce por tratamiento a bajas temperaturas, pero no se induce por tratamiento de estrés salino, ni por manitol ni por ABA (Cao et al., 2005), y que el mutante *gi-3* presenta una mayor sensibilidad a la congelación. Además, los tratamientos de frío tienen un efecto mayor sobre el tiempo de floración en *gi-3*, lo que sugiere que puede existir un vínculo entre el tiempo de floración y la respuesta al estrés mediado por el frío a través de *GI* (Cao et al., 2005). Otro ejemplo de mutantes implicados en el control del tiempo de floración que tienen alterada la respuesta al frío lo constituye el mutante de floración temprana *hos1*. La mutación *hos1* acelera el tiempo de floración por originar una disminución de la expresión de *FLC* (Lee et al 2001; Dong et al., 2006); *hos1* afecta a una E3-ubiquitina ligasa que ha sido implicada en la degradación de *ICE1*, un factor de transcripción implicado en la aclimatación a bajas temperaturas (Dong et al., 2006); esta degradación selectiva atenuaría la señalización por frío mediada por *ICE1* (Dong et al., 2006) y por ello muestra altos niveles de expresión de genes *CBFs* y de los genes regulados por estos, implicados en la respuesta y adaptación al frío (Lee et al 2001). Por otra parte, el locus *ATSIZ1* codifica una SUMO-E3 ligasa implicada en la tolerancia al frío, en la termotolerancia basal, en las respuestas de ayuno de fosfato, en la defensa a patógenos mediada por SA y el control del tiempo de floración (Miura et al., 2005 ; Yoo et al., 2006; Lee et al., 2007b; Lee et al., 2007c; Miura et al., 2007). La pérdida de función de este gen causa una hiper acumulación de ácido salicílico (SA) que se asocia a su fenotipo enano y de floración temprana, que puede ser revertido por la sobreexpresión de *NahG*, que codifica una salicilato hidroxilasa que evita la acumulación de SA (Miura et al., 2007; Jin et al., 2008). El fenotipo temprano de *siz1* en condiciones de DC se asocia con una baja expresión de *FLC* (Jin et al., 2008). De hecho, *SIZ1* media la sumolización de FLD, reprimiendo la deacetilación de histonas en la cromatina de *FLC* (Jin et al., 2008).

Hace varios años se propuso que el SA podía regular la floración (Cleland, 1974; Cleland y Ajami, 1974; Goto, 1981). Aunque las plantas tienen niveles basales bajos de SA (Raskin, 1992), su concentración aumenta paulatinamente cuando están sometidas a infecciones por patógenos (Dempsey et al., 1999; Raskin, 1992) ó después de haber sido irradiadas con luz UV-C (Yalpani et al., 1994). SA también regula la expresión génica durante la senescencia de hojas (Morris et al., 2000; He et al., 2001), durante el crecimiento celular (Vanacker et al., 2001), y durante la muerte celular (Shirasu y Schulze-Lefert, 2000) y también está implicada en la aceleración de la transición floral en respuesta a la irradiación con luz UV-C (Martínez et al., 2004). Así, la aceleración de la floración en respuesta a la irradiación con UV-C aumenta de forma proporcional a la activación de la respuestas de defensa mediada por SA, y dicha aceleración de la floración es totalmente dependiente de la acumulación de esta hormona, ya que esta respuesta no se observa en plantas transgénicas *nahG* que son incapaces de acumular SA (Martínez et al., 2004). De esta manera, las condiciones de estrés aumentan el contenido endógeno de SA, que activa la expresión de *FT* y las plantas deficientes en SA presentan niveles elevados de expresión de *FLC* y bajos de *FT* (Martínez et al., 2004). Asimismo, la acción del SA parece estar mediada en cierta manera por *SOC1*, ya que la

aplicación exógena de SA no puede acelerar la floración en el mutante *soc1* (Martínez et al., 2004). Por lo tanto, los datos obtenidos hasta el momento sugieren que el SA podría regular el tiempo de floración a través de al menos dos rutas diferentes, una en condiciones de DL dependiendo de la ruta del fotoperiodo y otra en condiciones de DC, dependiente únicamente de *FLC* (Martínez et al., 2004).

9. Integración de las señales que promueven la floración en *Arabidopsis*.

9.1. Relaciones entre los integradores florales *FT*, *SOC1*, *LFY* y *AGL24*.

Durante los últimos años se han realizado importantes progresos en el conocimiento de las bases moleculares de la integración de la información procedente de las distintas rutas que promueven la floración, determinándose que todas ellas lo hacen a nivel de la regulación transcripcional de los genes de control del tiempo de floración *FT* y *SOC1/AGL20* (Devlin y Kay, 2000; Araki, 2001; Turck et al., 2008). Recientemente se han aportado varias evidencias que también implican al gen *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)* en la integración de las señales de floración procedentes de la vernalización, fotoperiodo y de la ruta de las giberelinas, activando al gen *LFY* conjuntamente con *SOC1* (Lee et al, 2008; Liu et al, 2008b).

En la década de los años 30 del siglo pasado, varios investigadores realizaron los primeros experimentos para determinar donde se producía el estímulo floral. Diferentes observaciones determinaron que la duración del fotoperiodo se percibía en las hojas, mientras que la floración ocurría en el meristemo apical (Knott, 1934; Bonner y Hamner, 1938). Esto implicaba la existencia de una señal que se transmitía desde las hojas a otras partes de la planta. Posteriormente, se demostró que la señal inductora de la floración podía ser transmitida mediante un injerto de plantas inducidas para florecer, a plantas creciendo en condiciones no inductoras (Chailakhyan, 1936); de esta forma se introdujo el término "florigeno" como un estímulo que se dirigía al ápice a través del sistema floemático e iniciaba la floración. Como se comentó anteriormente, tanto la regulación de la expresión de *CO* como la regulación de la actividad y de la estabilidad de la proteína *CO*, son claves en el proceso que permite a *Arabidopsis* medir la longitud de los días (Hayama y Coupland, 2004). Con el uso de promotores inducibles para el análisis de la expresión de *CO*, se observó que la expresión de los genes *FT* y *SOC1* estaba regulada por la ruta de promoción de la floración dependiente de fotoperiodo (Samach et al., 2000); además, la expresión de *SOC1* también está regulada en parte por *FT* (Michaels et al. 2005; Yoo et al. 2005) y ambos integradores florales se hayan bajo el control negativo de *FLC*, el cual está regulado positivamente por el gen *FRI* y reprimido por las rutas de promoción autónoma y de vernalización (Koornneef et al., 1994; Michaels y Amasino, 1999a; Sheldon et al., 1999; Johanson et al., 2000; Sheldon et al., 2000b; Lee, 2005.). *FT* y *SOC1* son por lo tanto importantes integradores de estas tres vías y sus niveles de expresión están determinados por un balance entre las actividades de los genes *CO* y *FLC* (Lee et al., 2000; Samach et al., 2000; Searle et al., 2006) (figura 3).

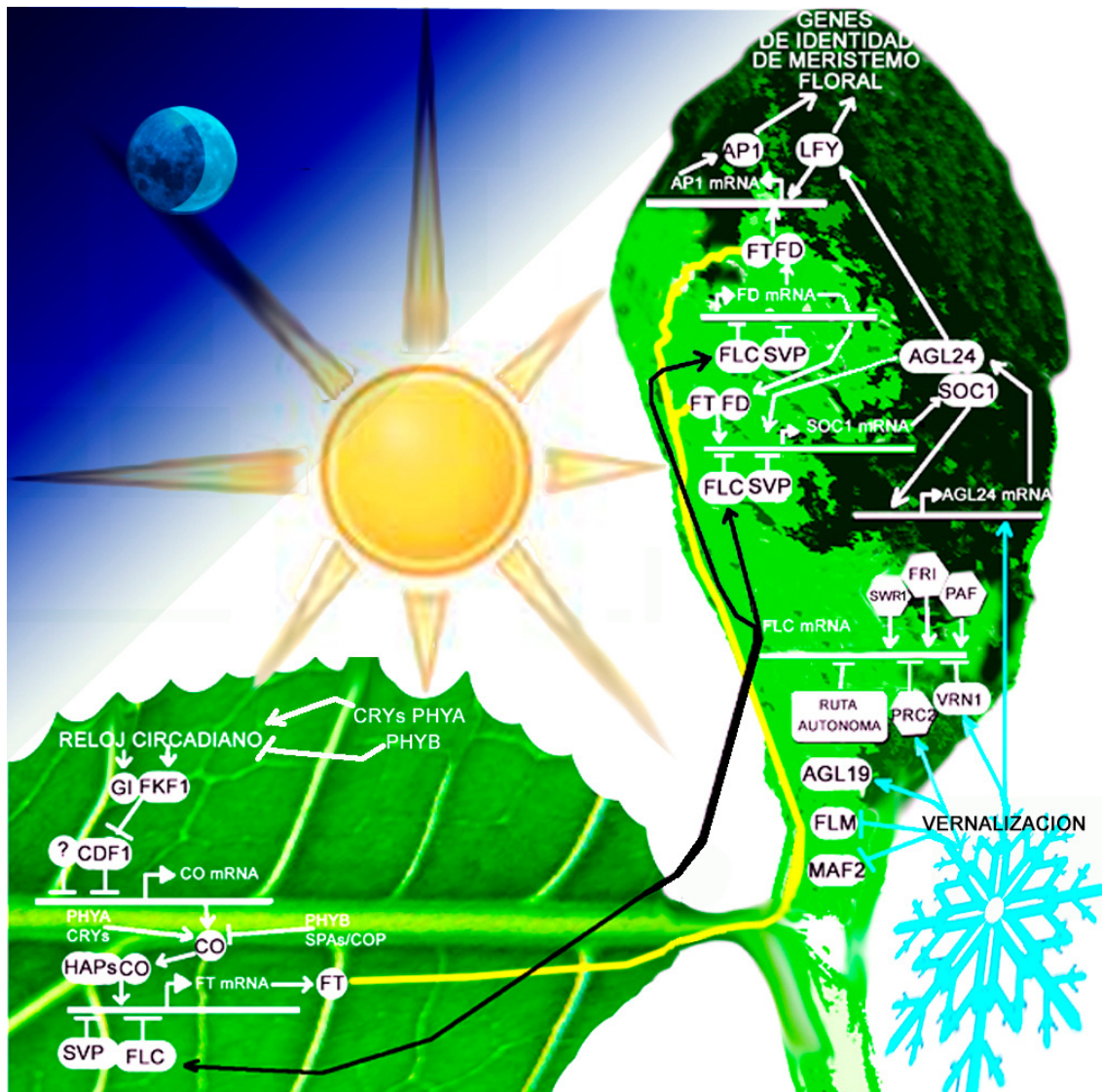


Figura 3. Integración de las señales que controlan la floración en *Arabidopsis thaliana*.

CO se expresa tanto en las venas distales como en las proximales de las hojas, en los tejidos floemáticos de las hojas jóvenes y en la región apical, por encima del protofloema (Simon et al., 1996; An et al., 2004). Sin embargo, la estabilidad de la proteína CO está regulada de manera estricta y los estudios realizados con fusiones traduccionales de CO a GFP, indican que el patrón espacial de la proteína CO se limita al floema (An et al., 2004). Por otro lado, tanto los datos obtenidos de experimentos con injertos, como los análisis con promotores que establecen la expresión de CO en el floema, en las células acompañantes de floema o en las células acompañantes de las venas menores, generan una señal transmisible que es suficiente para inducir la floración y revertir el fenotipo tardío del mutante *co* (Truernit y Saber, 1995; An et al., 2004; Ayre y Turgeon, 2004); sin embargo, la expresión de CO en el SAM no promueve la floración (An et al., 2004), por lo tanto la señal mediada por CO debe situarse aguas arriba del florigeno, la señal transmisible ubicada en las hojas. Por su parte, *FT* se expresa en las venas distales de las hojas, en concreto en las células acompañantes del

floema (Takada y Goto, 2003), y su expresión en el floema o en el SAM, causa una aceleración de la floración incluso en ausencia de función *CO*, *FT* o *LFY* (An et al., 2004; Abe et al., 2005a). Por lo tanto, estos datos indican que la inducción de la floración depende de una señal que se genera después de la transcripción de *FT* (Takada et al., 2003; An et al., 2004).

FT codifica una proteína pequeña, de unos 20 kDa, con homología al inhibidor de la proteína quinasa Raf (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999); sin embargo, su función bioquímica se desconoció hasta la identificación de su interacción *in vivo* con la proteína FD (Abe et al., 2005a), un factor de transcripción tipo bZIP necesario para que *FT* inicie en el meristemo apical una cascada de expresión de genes de identidad de meristemo floral (Abe et al., 2005a; Wigge et al., 2005). Como *FD* se expresa en el meristemo apical y *FT* se expresa en el floema, se sugirió la posibilidad de que el mensajero *FT*, la proteína *FT* o ambos pudieran ser las señales que se trasladasen durante la transición floral a través del floema hasta el meristemo apical (Huang et al., 2005; Giavalisco et al., 2006); en concreto, el hecho de que detectaran en el floema de brásicas y cucurbitáceas proteínas homólogas a *FT* tras la inducción floral, fue lo que sugirió inicialmente que la proteína *FT* fuese la responsable de esta inducción (Giavalisco et al., 2006; Lin et al., 2007). Los estudios posteriores realizados en *Arabidopsis* y arroz con fusiones traduccionales de *FT* a GFP concluyeron que la proteína *FT* es la que se transporta desde la hoja a través del floema, para realizar su función en el meristemo apical (Corbesier et al., 2007; Tamaki et al., 2007). Una vez *FT* alcanza la zona apical del tallo, el heterodímero *FT/FD* participa de la activación de los genes de identidad de meristemo floral *APETALA 1* (*AP1*) y *FRUITFUL* (*FUL*). De hecho, la expresión de *AP1* es muy baja en el mutante *fd* (Abe et al., 2005a) y no se detecta en los dobles mutantes *fd lfy*, ni *ft lfy*, lo que indica que el complejo *FT/FD* actúa redundantemente con *LFY* para activar a *AP1* (Ruiz-García et al., 1997; Samach et al., 2000; Abe et al., 2005a; Wigge et al., 2005). Del mismo modo, la sobre-expresión de *FT* causa la expresión ectópica en las hojas de *AP1*, *FUL*, *SEP3* y *CAULIFLOWER* (*CAL*; Abe et al., 2005a; Wigge et al., 2005), algo que no ocurre si se expresa en un fondo mutante *fd* (Teper-Bamnolker et al., 2005). Por lo tanto, el heterodímero *FT/FD* regula en el meristemo apical la expresión de los genes *AP1*, *FUL*, *SEP3* y *CAL*; además se ha propuesto la hipótesis de que *FT* se une al promotor de *AP1* a través del dominio de unión al DNA presente en *FD*, al existir un sitio de unión C-BOX en dicho promotor, que sería diana de factores de transcripción bZIP como *FD* y que además está muy próximo a los sitios de unión de *LFY* (Wigge et al., 2005); por otro lado, el papel de *FT* en el heterodímero podría ser el de actuar como un coactivador transcripcional, ya que experimentos de inmunoprecipitación de cromatina detectan a *FT* en el promotor de *AP1* (Wigge et al., 2005), o bien, *FT* podría ser necesario para regular post-traduccionamente a *FD* en el núcleo. Esta última hipótesis se apoya en experimentos de doble híbrido, donde se ha observado que una proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} parece ser necesaria para que ocurra la interacción de *FD* con *FT* (Abe et al., 2005a). En *Ler*, la expresión de *AP1* es detectable en el SAM cuatro días después de un cambio de condiciones de DC a DL, justo en el momento en el que la yema floral es visible. En

esta etapa del desarrollo floral no se requiere más la señal de *FT* en las hojas, ya que el meristemo floral ha adquirido la suficiente competencia para desarrollarse a expensas de esta señal (Corbesier et al., 2007). Por lo tanto, es poco probable que el primer proceso controlado por *FT* en el SAM sea la activación de *AP1*.

En ausencia de vernalización, la proteína FLC reprime la transcripción de *FT* en el floema y reduce la expresión de *SOC1* y *FD* en el meristemo (Searle et al. 2006). Existen evidencias de que la proteína FLC probablemente se una a los motivos de DNA CArG-box presentes en el primer intrón del gen *FT* y en los promotores de *FD* y *SOC1* (Searle et al., 2006; Helliwell et al., 2006), sugiriendo un mecanismo que limite la sensibilidad al fotoperíodo de las plantas durante el invierno y que restrinja la floración a los momentos óptimos del año.

Por su parte, la ruta de las GAs regula la expresión del integrador floral *SOC1* y del gen de identidad de meristemo floral *LFY* (Blázquez et al., 1998; Moon et al., 2003). Además, *SOC1* parece formar parte de una cascada transcripcional que resulta en la activación de *LFY* (Moon et al., 2005). Las mutaciones en *SOC1* causan un fenotipo de floración tardía tanto en condiciones de DL como DC (Borner et al., 2000); sin embargo, la inducción de la expresión de *SOC1* en el SAM se detecta mucho antes que la expresión de *AP1* y que los cambios macroscópicos que se producen en el meristemo tengan lugar (Borner et al., 2000; Searle et al., 2006). En este sentido, se ha podido observar que la inducción de *SOC1* está muy retrasada en los mutantes *ft* y *fd* (Searle et al., 2006), por lo que *SOC1* actuaría como un integrador floral que es activado por vías dependientes e independientes de *FT* (Lee et al., 2000; Onouchi et al., 2000; Samach et al., 2000; Yoo et al., 2005). Hasta el momento no hay evidencias directas de los genes diana regulados por la proteína *SOC1*, si bien se ha podido comprobar a través de experimentos con expresiones transitorias, que *SOC1* se localiza en el citoplasma y que se trasloca al núcleo cuando ésta se coexpresa con el activador de la floración *AGL24* (Lee et al., 2008); además, se ha podido determinar que ambas proteínas colocalizan en el núcleo y que *SOC1* se une a la región proximal del promotor de *LFY* (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008b).

AGL24 funciona como un activador de la floración (Yu et al., 2002). Este gen se expresa generalmente en órganos vegetativos antes de la transición floral, pero progresivamente su mensajero se va acumulando en los primordios florales hasta que finalmente su expresión queda limitada a los carpelos y estambres (Michaels et al., 2003b; Yu et al., 2004; Gregis et al., 2006). Coincide además el hecho de que *LFY* se exprese sólo en los tejidos donde las expresiones de *SOC1* y *AGL24* se superponen, proponiéndose que la heterodimerización de *SOC1* y *AGL24* sea un mecanismo clave en la activación de la expresión de *LFY* (Lee et al., 2008). Los mutantes *ag/24* son de floración tardía y su fenotipo es sólo ligeramente suprimido por vernalización, aunque en mayor medida que en los mutantes *soc1* (Michaels et al., 2003b). *SOC1* y *AGL24* activan su expresión de forma recíproca (Michaels et al., 2003b; Yu et al.,

2002) aunque difieren en varios aspectos en su regulación: en primer lugar, en la ruta del fotoperiodo, *AGL24* se activa a través de *CO*, pero no de *FT* (Yu et al., 2002), mientras que *SOC1* está regulado principalmente por *FT* e indirectamente por *CO* a través de un factor desconocido de unión al DNA (Lee et al., 2000; Samach et al., 2000; Hepworth et al., 2002). En segundo lugar y a diferencia de *SOC1*, *AGL24* se activa tras la vernalización de forma independiente a *FLC* (Michaels et al., 2003b), con lo que es otro ejemplo de un gen MADS-box implicado en vernalización. Por último, se ha descrito que *SOC1* y *AGL24* pueden promover la floración de forma independiente el uno del otro (Yu et al., 2002; Michaels et al., 2003b). Además, se ha descrito que el efecto de las GAs sobre la floración en condiciones de DC está mediado por la interacción entre *AGL24* y *SOC1* (Liu et al., 2008b). Estas observaciones sugieren que durante la transición floral, existe un bucle de retroalimentación positivo mediado por la regulación transcripcional entre *AGL24* y *SOC1*. Se podría considerar por lo tanto a *AGL24* como otro integrador de las señales de la floración procedentes de las rutas de vernalización, fotoperiodo y de las giberelinas, que participaría junto con *SOC1* en la activación de *LFY*. Por último, *AGL24* también regula la expresión de genes de identidad de meristemo floral (Gregis et al., 2006; Gregis et al., 2008). Los análisis genéticos, moleculares y bioquímicos realizados sugieren que ambas proteínas funcionan conjuntamente con AP1 para regular la expresión de *AG* (Gregis et al., 2006), y recientemente se ha demostrado que la represión de *SOC1* y de los genes *AGL24* y *SVP* por parte de AP1, es una etapa esencial en el establecimiento de la identidad de meristemo floral (Liu et al., 2007b). Todas estas observaciones apuntan a la existencia de un complejo mecanismo de retroalimentación negativa entre los diferentes genes regulados por el heterodímero FT/FD (Liu et al., 2007b).

Por último, *LFY* regula la identidad de los meristemos florales, ya que la pérdida de función de este gen provoca un fenotipo de flor alterado, que en combinación con las mutaciones *fd* o *ft*, provoca un fenotipo en el que se sustituyen las flores por hojas (Ruiz-García et al., 1997; Abe et al., 2005a; Wigge et al., 2005). El promotor del gen *LFY* juega un papel importante en la integración de las señales ambientales y endógenas que controlan el tiempo de floración, de manera que su expresión está regulada por *CO* a través de la ruta del fotoperiodo y por la ruta de promoción por GAs (Blázquez y Weigel, 2000; Samach et al., 2000); además, al igual que ocurre con otros genes de identidad de meristemo floral, la expresión ectópica de *LFY* causa un fenotipo de floración temprana (Weigel y Nilsson, 1995; Blázquez et al., 1998; Blázquez y Weigel, 2000).

9.2. Genes de la familia *FT-LIKE*.

En *Arabidopsis*, existe una pequeña familia de proteínas relacionadas con el integrador FT, denominadas FT-like; en concreto cinco de ellas, TWIN SISTER OF FT (TSF), BROTHER OF FT (BFT), ARABIDOPSIS THALIANA RELATIVE OF CENTRORADIALIS (ATC), MOTHER OF FT (MFT) y TERMINAL FLOWER 1 (TFL1), son las que presentan la mayor homología de

secuencia a *FT* y algunas han sido implicadas en la regulación del tiempo de floración (Bradley et al., 1997; Yoo et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005). Las proteínas codificadas por estos genes tienen en común un dominio de unión a fosfatidiletanolamina (PEPB) (Chardon et al., 2005), que en animales participan en cascadas de señalización a través de interacciones proteína-proteína.

TSF es la que presenta mayor homología con *FT* (81,3%); sus patrones de expresión en el floema no se superponen, aún existiendo homologías significativas en la parte proximal de sus promotores (Mathieu et al., 2007) y a diferencia de *FT*, *TSF* se expresa en la parte basal del meristemo apical (Mathieu et al., 2007). Asimismo, los análisis de expresión confirman que *TSF*, al igual que *FT*, responde rápidamente a la activación mediada por *CO* y es reprimida por la acción de *FLC* y de *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS)* (Yamaguchi et al., 2005); sin embargo, a diferencia de *FT*, su expresión no aumenta en el mutante *tfl2/lhp1*, a pesar de que en los ensayos tipo ChIP se detecte a TFL2/LHP1 asociado al locus *TSF* (Turck et al., 2007). Las plantas transgénicas que expresan un miRNA artificial dirigido contra *FT* y *TSF* en el floema presentan el mismo fenotipo que el doble mutante *ft tsf*, pero si el miRNA se expresa bajo el control del promotor de *FD*, el tiempo de floración no se ve afectado (Mathieu et al., 2007), lo que sugiere que los mensajeros de *TSF* y *FT* son únicamente necesarios para realizar su función en las células acompañantes del floema (Mathieu et al., 2007). Por lo tanto, *TSF* podría regular la floración por un mecanismo similar al propuesto para *FT*, pero hasta ahora se desconoce si la proteína de *TSF* se transporta al SAM por el floema, junto con *FT*. Por otro lado, mientras que en condiciones de DL, los mutantes *ft* y *tsf* florecen de forma tardía, las observaciones realizadas en condiciones de DC por los diferentes grupos de investigación son contradictorias. Así Michaels y colaboradores (Michaels et al., 2005) no han encontrado un efecto sobre el tiempo de floración en las mutaciones *ft* o *tsf* en condiciones de DC, mientras que Yamaguchi y colaboradores (Yamaguchi et al., 2005) observan un efecto en el mutante *tsf* y una potenciación del mismo en el doble mutante *ft tsf* (Michaels et al., 2005, Yamaguchi et al., 2005). En cualquier caso, incluso en ausencia de ambos genes, las plantas florecen en condiciones de DC, lo que indica que no es imprescindible la señal mediada por *FT/TSF* para que se produzca la transición floral. Una posible hipótesis para explicar esta observación sería la existencia de una vía alternativa que promoviera la floración en condiciones de DC en la ausencia de *FT/TSF*. En este sentido, los datos genéticos sugieren que las GAs poseen un papel importante en el control de la floración bajo condiciones de DC (Wilson et al., 1992); de hecho, en esas condiciones dichas hormonas se acumulan en el meristemo durante la transición floral (Eriksson et al., 2006). Así por ejemplo, en *Lolium* se ha propuesto que estas hormonas forman parte de una señal sistémica que induce la floración e igualmente podrían representar en *Arabidopsis* una señal independiente del fotoperíodo que actuara en paralelo con *FT* (King et al., 2003).

Otro miembro de la familia *FT*, *TFL1*, tiene un efecto antagónico sobre *FT* en la regulación del tiempo de floración. Así, el mutante *tfl1* presenta un fenotipo de floración temprana independiente del fotoperiodo y desarrolla una flor terminal de forma similar a como lo hacen las plantas transgénicas que sobre-expresan *FT* (Bradley et al., 1997; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Por el contrario, la sobre-expresión de *TFL1* provoca un fenotipo de floración tardío sólo en condiciones de DL y presenta un fenotipo de inflorescencia muy similar al mutante *ft* (Ratcliffe et al., 1998). Paradójicamente, la expresión de *TFL1* aumenta en los meristemas de la inflorescencia mediante la activación de *CO* (Simon et al., 1996). Existen varias hipótesis que explicarían esta observación; se piensa que *TFL1* actúa como un competidor de *FT* en el meristemo apical, previniendo el desarrollo de meristemas florales dentro del meristemo apical (Ahn et al., 2006). De acuerdo con esta hipótesis, mientras que la expresión de *TFL1* se limita al centro del SAM, la localización de su proteína se extiende en la totalidad del meristemo (Conti et al., 2007). Por otro lado, se ha propuesto también un mecanismo de unión competitiva de *FT* y *FD* a *TFL1*, aunque se desconoce si *FD* y *TFL1* interactúan (Abe et al., 2005a; Wigge et al., 2005). En última instancia, puesto que en respuesta a la activación de *CO*, la transcripción de *LFY* y de *TFL1* se inicia rápidamente en contraposición a la transcripción de *AP1*, que ocurre mucho más tarde, se ha propuesto que *CO* actuaría dentro de una ruta que es suficiente para activar la transcripción de *LFY* y *TFL1*, mientras que la activación de *AP1* requeriría una ruta adicional (Simon et al., 1996).

Para *BFT* y *ATC*, homólogos de *TFL1*, no se ha demostrado su posible papel en el control del tiempo de floración de *Arabidopsis*, ya que aún no se han aislado mutantes para *BFT* y los mutantes *atc* no muestra alteraciones en la floración o en el desarrollo de la flor (Mimida et al., 2001). Por su parte, la sobre-expresión de *MFT* provoca un fenotipo de floración temprana en DL, si bien la pérdida de función *MTF* no tiene un efecto perceptible sobre la floración (Yoo et al., 2004). No obstante, para comprender cómo estos genes contribuyen al tiempo de floración, será necesario describir los patrones de expresión de cada uno de ellos y establecer las relaciones genéticas existentes entre ellos, combinando los alelos nulos de los distintos homólogos de familia *FT-like*.

10. Factores implicados en la remodelación de la cromatina que participan en la represión de la expresión de genes integradores, de identidad de meristemo y de órgano floral durante el desarrollo vegetativo.

La estructura de la cromatina viene determinada por un gran número de factores que proporcionan las marcas epigenéticas de las histonas y del DNA, y que influyen de forma decisiva en la actividad transcripcional de genes reguladores que controlan el desarrollo de órganos y tejidos, que modulan las respuesta a las señales ambientales como la luz y la temperatura, y que determinan los patrones de desarrollo en respuesta a situaciones de estrés (Farrona et al., 2008; Chinnusamy et al., 2009; Jarillo et al., 2009). Así, el mantenimiento de las

modificaciones de la cromatina a lo largo de la división celular garantiza el establecimiento de un patrón de desarrollo adecuado en respuesta a cambios en los estímulos ambientales (Reyes, 2006).

Tal como hemos descrito previamente en el apartado 4, diversos procesos de remodelación de cromatina participan en el control del tiempo de floración a través de la regulación del gen *FLC*, que se ha adoptado como modelo de regulación epigenética del desarrollo en plantas (Schmitz y Amasino, 2007). Otros reguladores centrales de este proceso, como *FT*, también están controlados por mecanismos que implican cambios en la organización de la cromatina (Piñeiro et al., 2003; Takada y Goto, 2003; Jiang et al., 2008). Así por ejemplo, tanto mutaciones en *TFL2/LHP1* como en *EBS* causan una aceleración de la floración en condiciones de fotoperiodos no inductivos, debido a que ambas proteínas son necesarias para reprimir la activación de *FT* (Gómez-Mena et al., 2001; Piñeiro et al., 2003; Takada y Goto, 2003). El locus *EBS* también reprime la expresión de genes de identidad de meristemo floral como *AG*, *PISTILLATA (PI)* y *AP3* (Gómez-Mena et al., 2001) y codifica una proteína que contiene un dominio BAH (Bromo Adjacent Homology), un dedo de Zn de tipo PLANT HOMEODOMAIN (PHD) y una señal de localización nuclear en el extremo carboxilo terminal (Piñeiro et al., 2003). El dominio PHD podría estar implicado en leer el código de histonas y traducirlo en patrones de expresión génica que controlen diferentes procesos de desarrollo (Soliman y Riabowol, 2007). Por otro lado, el dominio BAH frecuentemente está asociado con otros motivos implicados en mecanismos epigenéticos de la regulación génica como son los dominios bromo y SET, así como con los dedos de Zn tipo PHD. De esta forma, el dominio BAH podría tener un papel importante en el acoplamiento de la metilación, replicación e inactivación de genes mediante procesos de remodelación de la cromatina (Callebaut et al., 1999). La presencia de estos dominios tanto en *EBS* como en su homólogo *SHL* (López-González et al., 2009), sugiere que ambos formarían parte de un complejo proteico implicado en la regulación transcripcional de genes mediante el reconocimiento de marcas de histonas modificadas en la cromatina (Piñeiro et al., 2003).

Por su parte *TFL2/LHP1*, además de mantener la cromatina del locus *FLC* en un estado inactivo tras la vernalización (Sung et al. 2006), también participa en el silenciamiento de otros genes tales como *FT* (Gaudin et al. 2001; Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007) y genes de identidad de órgano floral (Kotake et al., 2003; Takada y Goto, 2003; Libault et al., 2005; Nakahigashi et al., 2005; Germann et al., 2006), reprimiendo de esta forma varios loci presentes en regiones de eucromatina (Libault et al. 2005; Nakahigashi et al. 2005). *TFL2/LHP1* codifica una proteína cuya estructura se caracteriza por la presencia de un cromodominio en la zona amino terminal y un dominio *chromoshadow* en la región carboxilo (CSD) (Gaudin et al. 2001); se ha determinado que el dominio CSD de la proteína homóloga HP1 interacciona con numerosas proteínas (revisado en Li et al, 2002) y que muchas de estas interacciones juegan un papel importante en la formación de la heterocromatina y/o en el

establecimiento del silenciamiento génico (Fanti y Pimpinelli, 2008). Existen además otras proteínas implicadas en mecanismos de remodelación de la cromatina que desempeñan un papel fundamental en la represión de genes reguladores del desarrollo reproductivo en *Arabidopsis*, cuyas mutaciones también aceleran el tiempo de floración (Wagner y Meyerowitz, 2002; Farrona et al., 2008). Así, las proteínas homólogas a las del PcG de *Drosophila* como CLF, FIE y EMF2 actúan reprimiendo la expresión de genes integradores florales como *FT*, y de genes de identidad de meristemo y de órgano floral durante el desarrollo vegetativo (Pien y Grossniklaus, 2007; Jiang et al., 2008). Así, se ha demostrado que CLF se une directamente al locus *FT* y media la deposición de la marca H3K27me3 en su cromatina (Jiang et al., 2008). De la misma manera, la elevada expresión de *STM* y *AG* observada en el mutante *clf* se correlaciona con una disminución de la metilación de lisinas 9 y 27 de la histona H3 (K9H3me y K27H3me) y un aumento de metilación en la lisina 4 de la histona H3 (K4H3me) de estos loci (Schubert et al., 2006). Por su parte, el homólogo de la ATPasa de la familia SWI/SNF, SYD, regula al gen de identidad de meristemo *WUS* (Kwon et al., 2007), que junto con *LFY* tiene un papel central en el control del desarrollo de meristemos florales. De igual manera, AtBRM, otra proteína de la familia SNF2 relacionada con SYD, reprime la transición floral inhibiendo la activación de *CO*, de *FT* y de *SOC1* (Farrona et al., 2004). Todas estas observaciones sugieren que en las plantas coexisten diferentes proteínas implicadas en procesos remodeladores de la cromatina que cooperan para reprimir factores implicados en la organogénesis floral y en la actividad del meristemo durante el desarrollo vegetativo.

En los últimos años se han aislado otros mutantes con fenotipos de floración temprana, afectados en factores relacionados con la replicación del DNA, y que también presentan alteraciones en procesos de silenciamiento transcripcional (Elmayan et al., 2005; Kapoor et al., 2005a; Kapoor et al., 2005b; Xia et al., 2006; Barrero et al. 2007; Del Olmo et al., 2009). En muchos casos, la pérdida total de función de estos genes provoca fenotipos embrionarios letales, lo que indica su participación en mecanismos celulares básicos necesarios para el correcto desarrollo del embrión. Así por ejemplo, *ICU2* codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa α de *Arabidopsis* y el mutante de pérdida de función parcial *icu2-1* presenta un fenotipo floración temprana (Barrero et al. 2007). *ICU2* ha sido implicado en mecanismos de represión transcripcional de genes tales como *FT*, *SOC1*, *AG*, y de genes de identidad de meristemo y de órgano floral; además, se ha sugerido que *ICU2* mediaría en la represión mecanismos de remodelación de la cromatina encargados de depositar marcas epigenéticas activas y que su función represora podría estar mediada a través de la interacción con TFL2/LHP1 (Barrero et al. 2007). Paralelamente, se han caracterizado otros mutantes con fenotipo de floración temprana afectados en otras DNA polimerasas. Tal es el caso del mutante *esd7*, aislado en nuestro grupo de investigación y objeto de estudio en esta tesis doctoral, que como se expondrá en las sucesivas páginas es portador de una mutación puntual en la subunidad catalítica de la DNA polimerasa epsilon (ϵ).



OBJETIVOS

Como se ha expuesto a lo largo de la introducción, las distintas rutas que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis*, convergen en la activación de los mismos genes, los integradores florales. Esta convergencia de rutas en un pequeño número de genes podría ser la clave de la integración de las diferentes señales, de manera que la planta desencadene una respuesta coordinada bajo situaciones en las que las condiciones medioambientales cambian simultáneamente.

Nuestro grupo de investigación está interesado en profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el tiempo de floración, y en particular en aquellos factores que inhiben el inicio de la floración hasta que la planta se encuentra en las condiciones medioambientales óptimas, o alcanza el nivel de desarrollo adecuado para florecer. Por norma general, los genes que se han ido identificando mediante mutaciones tempranas han sido situados en las rutas clásicas de promoción de la floración, y muchos de ellos parecen deber su fenotipo de floración temprana a la activación de genes integradores o de genes responsables de la formación de flores. Sin embargo, se han descrito otros mutantes tempranos cuyas interacciones genéticas no encajan claramente en el modelo, lo que podría revelar la existencia de comunicación entre las rutas fuera del nivel de los integradores.

En el presente trabajo se planteó como objetivo general, la caracterización genética y molecular del locus *EARLY IN SHORT DAYS 7 (ESD7)*, un posible represor del tiempo de floración en *Arabidopsis* aislado en nuestro grupo. Con el fin de analizar la función de *ESD7* en la regulación del tiempo de floración se abordaron los siguientes objetivos concretos:

- Clonación y caracterización a nivel molecular del locus responsable de la mutación de floración temprana *esd7*.
- Caracterización fenotípica a nivel macroscópico y microscópico del mutante *esd7-1*.
- Determinación de la composición del complejo de *Arabidopsis* del que forma parte *ESD7*, en comparación con otros modelos eucariotas.
- Integración del mutante *esd7-1* en el modelo conceptual del control del tiempo de floración.
- Análisis transcriptómico global y determinación de los niveles de expresión de los genes centrales que controlan la transición floral en el mutante *esd7-1*.
- Determinación de los niveles de expresión en el mutante *esd7-1* de genes implicados en mecanismos de reparación del DNA, con el fin de desvelar la posible participación de *ESD7* en procesos de reparación en plantas y explicar su mayor susceptibilidad al estrés genotóxico.
- Determinación de posibles interacciones de *ESD7* con factores implicados en replicación del DNA como *ICU2*, en la remodelación de la cromatina, como *TFL2/LHP1* y *FAS2*, o en el reconocimiento de marcas epigenéticas, como *EBS*.
- Determinación de modificaciones epigenéticas en la cromatina de loci regulados por *ESD7*.

The background is a dark, textured surface with a vertical green light streak and several red bokeh spots.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microscopía de fluorescencia de la raíz del mutante
esd7-1 portando la construcción *CYC1B;1::GFP*

11. Material vegetal.

Durante la realización de este trabajo se ha utilizado *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh como organismo modelo y *Nicotiana benthamiana* para realizar ensayos de interacción de proteínas “*in planta*”. De los distintos ecotipos que presenta esta especie se han empleado los ecotipos silvestres Ler y Col. Además, se ha usado un cruce realizado entre Ler y Wassilewskija (Ws) y líneas mutantes obtenidas tanto en los bancos de semillas ABRC y NASC, como las aportadas por los distintos grupos que trabajan en floración (tabla 1). La línea portadora del elemento transponible *Ds*, denominada Tn1, fue amablemente cedida por el Dr. G. Coupland.

Alelo	Locus	Fondo genético	Referencia	Fenotipo de floración
<i>fha-1</i>	<i>CRY2/ FHA</i>	Ler	Koornneef et al, 1991	Tardía en DL
<i>gi3</i>	<i>GI</i>	Ler	Koornneef et al, 1991	tardía en DL
<i>co2-1</i>	<i>CO</i>	Ler	Koornneef et al, 1991	tardía en DL
<i>fve-1</i>	<i>FVE</i>	Ler	Koornneef et al, 1991	Tardía
<i>fca-1</i>	<i>FCA</i>	Ler	Koornneef et al, 1991	Tardía
<i>spy-5</i>	<i>SPY</i>	Ler	Jacobsen et al, 1993	Temprana
<i>ga1-3</i>	<i>GA1</i>	Ler	Talon et al, 1990	Tardía en DL y necesita GA para florecer en DC
<i>ga2-1</i>	<i>GA2</i>	Ler	Koornneef et al, 1980	Tardía en DL
<i>ft-1</i>	<i>FT</i>	Ler	Koornneef et al, 1991	Tardía
<i>soc1-1</i>	<i>SOC1</i>	Ler	Onouchi et al, 2000	Tardía
<i>fd-1</i>	<i>FD</i>	Ler	Abe et al., 2005a	Tardía
<i>tfl2-1</i>	<i>TFL2</i>	Col	Larsson et al., 1998	Temprana
<i>ebs-1</i>	<i>EBS</i>	Ler	Gómez-Mena et al., 2001	Temprana
<i>icu2-1</i>	<i>ICU2</i>	Ler	Barrero et al., 2007	Temprana
<i>fas2-1</i>	<i>FAS2</i>	Ler	Kaya et al., 2001	Tardía
<i>lfy-5</i>	<i>LFY</i>	Ler	Weigel et al. 1992	Sin fenotipo de floración
<i>ap1-1</i>	<i>AP</i>	Ler	Koornneef et al, 1983	Sin fenotipo de floración
<i>til1-4</i>	<i>ESD7/TIL1</i>	Ws/ Ler	Jenik et al. 2005	Temprana en DC
<i>SALK_057024</i>	<i>ESD7/TIL1</i>	Col	-	Letal embrionario
<i>SAIL_95_B07</i>	<i>ESD7/TIL1</i>	Col	-	Letal embrionario
<i>emb2284-1</i>	<i>ESD7/TIL1</i>	Col	Tzafrir et al, 2004	Letal embrionario
<i>SAIL_1148_A10</i>	<i>ESD7/TIL1</i>	Col	-	Letal embrionario
<i>SALK_092684</i>	<i>POL2B/TIL2</i>	Col	Jenik et al. 2005	Letal embrionario
<i>SAIL_1223</i>	<i>DPB2</i>	Col	-	Letal embrionario

Tabla 1. Líneas mutantes.

El mutante *esd7-1* se encuentra en un fondo genético *Ler* y todos los cruces se han realizado con líneas mutantes con el mismo fondo genético con el fin de evitar la combinación de alelos de dos ecotipos diferentes. Por otro lado, se intrograsaron los alelos mutantes *esd7-1* e *icu2-1* en fondo genético *Col* y *Ler* respectivamente, con el objeto de realizar los cruces pertinentes con los alelos mutantes o con las plantas transgénicas que presentan este mismo fondo genético.

Los alelos mutantes (*SALK_057024*, *SAIL_95_B07*, *emb2284-1*, *SAIL_1148_A10*, *SALK_092684*) corresponden a las líneas de inserción portadoras de un T-DNA en fondo Columbia y fueron adquiridas de la colección del NASC (N557024, N804550, N16046, N842237, N592694). Los cebadores utilizados para localizar las inserciones fueron el cebador LB1 o LBb1, para las líneas pertenecientes al SALK y SAIL respectivamente (LBb1: GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT; LB1 TCAGAAATGGATAAATAGCCTTGTC) localizados en el T-DNA y los cebadores de los genes expresados en la tabla 2.

Alelo	LP	RP
<i>SALK_057024</i>	CGAGAGATCCGTCATGCTAAG	ACCTTAGGCTTCTTCGACCAC
<i>SAIL_95_B07</i>	AATGAGTGGCAGCACCTT	CATTGTCTGCGAGATGATTCC
<i>SAIL_1148_A10</i>	AAGCCGAATTTCTTGATCCTG	AGACTAAGCCCCAAAGACGGAG
<i>SALK_092684</i>	AGCCCTCATAAAAAGTGAGGC	ATGATTGAGCACATGGAAGC
<i>SAIL_1223</i>	CCTTCCCCTTTGAGAAATCAG	CCGCCCAAAAAGAAATTAAG

Tabla 2. Cebadores utilizados en la caracterización de alelos mutantes portadores de inserciones de T-DNA

En la tabla 3 se muestran las líneas transgénicas utilizadas durante el transcurso de este trabajo. Estas líneas fueron amablemente cedidas los distintos grupos que trabajan en desarrollo de *Arabidopsis*, incluyendo grupos que trabajan en floración.

Línea transgénicas	Fondo genético	Referencia
<i>SCR::GFP</i>	<i>Col</i>	Wysocka-Diller J.W et al., 2000
<i>FLC::uidA</i>	<i>Col</i>	Sheldon et al., 2002
<i>CLV3::uidA</i>	<i>Col</i>	Brand et al 2002
<i>STM::uidA</i>	<i>Col</i>	Long et al., 1996
<i>FT::uidA</i>	<i>Ler</i>	Takada y Goto, 2003
<i>CO::uidA</i>	<i>Ler</i>	An et al 2004

Tabla 3. Líneas transgénicas utilizadas a lo largo de este trabajo.

12. Condiciones de cultivo de las plantas.

Las condiciones de cultivo de las plantas variaron dependiendo del tipo de análisis que se iba a realizar. Para los experimentos destinados a analizar el tiempo de floración y generación de

dobles mutantes, las semillas fueron sembradas directamente en bandejas de 28 alveolos conteniendo un sustrato compuesto por mezcla de compost de turba y vermiculita, en proporción 3:1. Posteriormente las semillas fueron estratificadas durante 4 días a 4° C para promover una germinación homogénea, y cultivadas en cámaras climatizadas.

Para los experimentos de mapeo posicional, las semillas de la generación F2 junto con las correspondientes líneas parentales y/o plantas silvestres, fueron esterilizadas durante 10 minutos en una solución de lejía comercial al 60%, con Tritón X-100 al 0.01% (v/v) y lavadas posteriormente con agua destilada estéril. Posteriormente las semillas fueron sembradas en placas Petri con medio MS (suplementado con un 1% con sacarosa (p/v), 0,8% de agar (medio GM sólido). Las semillas así dispuestas, fueron estratificadas y cultivadas aproximadamente una semana en una cámara climatizada de cultivo in Vitro, (22 °C, 16 horas de luz fluorescente blanca fría ($\sim 120 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad). La plántulas fueron posteriormente transplantadas a bandejas de 28 alveolos, conteniendo sustrato y cultivadas en cámaras climatizadas (22° C, 16 horas de luz fluorescente blanca fría ($\sim 120 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 8 horas de oscuridad y 65% de humedad relativa. Posteriormente estas plantas fueron seleccionadas y el material vegetal fue recogido para su posterior genotipado molecular.

En el caso de la selección de líneas transgénicas el procedimiento fue similar, pero las semillas T1 una vez esterilizadas fueron sembradas a una densidad 50 semillas/ cm^2 , en medio GM sólido suplementado con la concentración de antibiótico pertinente (Kanamicina 50 $\mu\text{g/mL}$; Higromicina 40 $\mu\text{g/mL}$; medio selectivo). Una vez obtenidas las semillas de las generaciones T2, se sembraron en las mismas condiciones 200 semillas de cada generación de forma independiente y las líneas transgénicas se seleccionaron atendiendo a la tasa de supervivencia en medio selectivo. La proporción 3:4 se tomó como indicativa de que las líneas portan una sola inserción de T-DNA.

Para los análisis transcripcionales mediante RT-PCR o mediante microordenamientos de DNA, las semillas fueron esterilizadas de modo similar al anteriormente descrito y sembradas a una densidad de 25 semillas/ cm^2 , en placas Petri con medio MS suplementado con un 0,8% de agar (Medio MS sólido) y con la concentración de droga pertinente en caso de ser necesario. Posteriormente, las semillas fueron estratificadas y cultivadas en una cámara climatizada de cultivo in vitro. En el caso de las plantas en fondo genético *Ler*, destinadas a los análisis transcripcionales, fueron cultivadas durante una semana en cámaras climatizadas (22° C, 16 horas de luz fluorescente blanca fría ($\sim 120 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 8 horas de oscuridad y 65% de humedad relativa, condiciones de DL) o dos semanas (22° C, 8 horas de luz fluorescente blanca fría ($\sim 120 \mu \text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 16 horas de oscuridad y 65% de humedad relativa, condiciones de DC). Para este mismo tipo de ensayos el fondo genético Col las plantas se cultivaron en condiciones de DL durante 11 días y durante 22 días en condiciones de DC. Posteriormente el

material vegetal fue recogido en N₂ (l) para su posterior procesamiento y/o analizadas dependiendo del experimento.

Para los análisis con las drogas MMC y BLE las plantas fueron cultivadas durante 10 días tanto en medio GM sólido como líquido suplementado con ambas drogas. Transcurrido este tiempo se analizó el estado de desarrollo y la tasa de supervivencia de cada una de las plantas.

Para los experimentos de regulación de la expresión de *ESD7* por stress genotóxico, las semillas después de ser esterilizadas fueron sembradas a una densidad de 25 semillas/cm² en placas Petri con medio MS sólido y cultivadas en una cámara climatizada de cultivo in vitro durante 7 días. Posteriormente fueron transferidas a un medio MS líquido suplementado con las drogas BLE y MMC (1,5 µg/mL y 66.7 µM, respectivamente). Este cultivo en suspensión se mantuvo en cultivo in vitro en agitación (120 r.p.m) durante 6 h, después de las cuales las plántulas se congelaron en N₂ (l) y almacenaron a -80°C para el posterior aislamiento del RNA.

13. Análisis fenotípicos.

13.1. Cuantificación del tiempo de floración.

El tiempo de floración está directamente relacionado con el número de hojas predeterminadas en el momento de la aparición del primer botón floral (Koornneef et al., 1991). De acuerdo con esta premisa, se contabilizó el número total de hojas excepto los cotiledones, es decir, las hojas de la roseta y las hojas caulinares de la inflorescencia principal. Los datos se presentan como la media de los valores obtenidos \pm la desviación estándar (S/\sqrt{n}). Los experimentos fueron repetidos tres veces en DL y dos veces en DC. El tamaño de la muestra fue de 20 plantas en condiciones de DC y osciló entre 30 y 50 en DL.

13.2. Medida del crecimiento de la raíz principal.

Para estimar el crecimiento de la raíz principal se analizaron plántulas cultivadas en cámaras de cultivo in vitro, en placas Petri en posición vertical con medio GM en agar al 1.6 %. Las mediciones de la raíz principal se hicieron a los 5, 8-10 y 13-15 días después de la germinación, de forma similar a la descrita por Casimiro et al. (2001). Los experimentos fueron repetidos tres veces y el tamaño de la muestra osciló entre 30 y 40 plantas.

13.3. Cuantificación del número de células.

Para analizar el número de células, se realizó un recuento de las células epidérmicas de la hoja, de la primera y tercera hojas de la roseta. Para ello, las plantas fueron cultivadas en cámaras de cultivo in vitro en placas Petri en posición horizontal con medio GM. Para las preparaciones de microscopía óptica, las hojas fueron cortadas y fijadas por infiltración al vacío

durante 10 minutos, en una solución de etanol 70% / glutaraldehído 2% en tampón fosfato 0.1 M. Las muestras así procesadas se dejaron a 4° C 24 h, para ser transferidas posteriormente a una solución 70% de etanol. Esta solución se cambió cada 3 días en el intervalo de dos semanas. Cuando las hojas perdieron toda la pigmentación, se montaron en portaobjetos orientando la cara adaxial y se observaron las células al microscopio óptico invertido. El recuento de células se estableció conforme al recuento del número de células por campo, a 400 aumentos (Tsukaya, 2002).

Para los análisis SEM, las plantas fueron cultivadas de forma similar, congeladas en N₂ (l), sombreadas con una mezcla de Au/Pd coloidal e introducidas en equipo para observación de muestras a baja temperatura (LTSEM), unido a un microscopio electrónico de barrido Zeiss 960 con un detector de electrones (BSE).

En ambas microscopías se contaron las células de tres campos diferentes de tres hojas independientes pertenecientes a la 1ª y 3ª hoja de la roseta de cada una de las plantas seleccionadas. Además en los análisis SEM se utilizó el software ImageJ 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), para cuantificar la superficie celular de todo el campo de visión de tres zonas diferentes de cada hoja.

13.4. Medida de las fases del desarrollo vegetativo.

Las semillas se sembraron en sustrato y vermiculita en condiciones de DL. Cuando la altura de la plantas fue de 5cm, se contaron por separado el número de hojas juveniles, que sólo poseen tricomas en su cara adaxial, el número de hojas adultas, que poseen tricomas en ambas caras y el número de hojas caulinares, que pierden casi completamente los tricomas en la cara adaxial (Telfer et al., 1997). El tamaño de la muestra fue entre 20 y 30 plantas.

13.5. Medida del tamaño de los frutos.

Las semillas se sembraron en sustrato y vermiculita en condiciones de DL y se midió el tamaño de las silicuas totalmente formadas con una regla. La muestra está formada por 50 silicuas de cuatro plantas independientes.

14. Análisis genéticos.

14.1. Métodos de manipulación y análisis de DNA genómico vegetal.

Aproximadamente una hoja de material fresco fue procesado en un tubo eppendorf conteniendo bolas de vidrio de 1 mm de diámetro, donde después de haber depositado el tejido y haber congelado su contenido en N₂ líquido, los tubos fueron introducidos en un molino agitador (SILAMAT 5s, Schaan, Principality of Liechtenstein) con el fin de que las bolas cizallen

y muelan la muestra congelada. Finalmente, el DNA genómico se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Bernatzky y Tanksley (1986).

La determinación de las concentraciones de las soluciones de DNA, se estimó en geles de agarosa al 0,8% en TBE (p/v) mediante la comparación con muestras de DNA de concentración conocida o determinando la absorción a 260 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA). Las digestiones de DNA con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo mediante los métodos usuales (Sambrook et al., 1989) siguiendo en cada caso las recomendaciones específicas de cada fabricante.

Las electroforesis de DNA se realizaron en geles de agarosa de concentración variable entre 0,8 y 4 % en TBE (p/v), en función del tamaño esperado de los fragmentos a resolver.

Para la detección de fragmentos específicos de DNA mediante hibridaciones tipo Southern, el DNA se transfirió a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham-Pharmacia), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Esta transferencia se realizó por métodos convencionales (Sambrook et al., 1989) durante 14-16 horas.

Para el genotipado de los dobles mutantes, se utilizaron marcadores ya publicados o bien se diseñaron a partir de la información sobre el polimorfismo que genera su mutación con respecto a la planta silvestre (tabla 3).

14.2. Desarrollo de marcadores genéticos moleculares.

Para el mapeo del locus *ESD7* se utilizaron o desarrollaron los siguientes marcadores polimórficos entre los ecotipos silvestres Ler y Col (tabla 3). Para ello se hizo uso de la secuencia completa disponible del genoma de *Arabidopsis* del ecotipo Col obtenidas en las bases de datos de TAIR, las bases de datos de CERION GENOMICS y TIGR (The institute for genomic research for Landsberg erecta random sequence Database (Ler)).

Los marcadores diseñados son del tipo: CAPS, polimorfismos obtenidos por restricción de productos de PCR. Para identificar estos polimorfismos se diseñaron parejas de cebadores separados entre 300-1000 pb en las regiones genómicas donde existe el polimorfismo entre ambos ecotipos, de tal forma que se origina un sitio de restricción. dCAPS, idénticos a los anteriores en tamaño pero uno de los cebadores diseñados, posee un nucleótido no solapante, que genera un punto de restricción donde existe el polimorfismo entre ambos ecotipos. INDEL, donde el polimorfismo se presenta como una delección o bien una inserción de 10-20 pb.

MARCADOR	TIPO	ENZIMA	DIRECTO	REVERSO
F24B9	INDEL	-	CACCAGCCTCCTCAGCTCTCGTC GCCG	GGCTGTTTTGCTTTGTTACCGAC TGG
F7G19	INDEL	-	TTCAAAAATCGTGAGATGAAATG	TCGTTGAAAACGATTAGATTGG
T23G18-88554*	INDEL	-	CGTTTGGGCTGTTAGATTGTAGC	GAGGCTTTCAGTTTGACCCC
T23G18-AccI*	dCAPS	<i>Acc I</i>	CTTGCCATCTTATTCTCCCGG	GAGGCAGGTGGTTACGCATT
T23G18-DdeI*	dCAPS	<i>Dde I</i>	AATATTGAAAATCATCCCCAAC	CAATCTTGTTCTCCTGCCTAC
T23G18-EcoRV*	dCAPS	<i>Eco RV</i>	GGGAAGAAGTAGTTGATGCTGG	GAGCCATGTCACGGAAGCGGAGG
T23G18-TaqI*	dCAPS	<i>Taq I</i>	CGGAATCTTAACGGTGGAAC	GAAGAAAGTAGTGGAAGAGACA
T23G18-AhaI	CAPS	<i>Aha I</i>	CGTATAAGTTCCGCATTTCTT	GAGCAATGTAACCGTCAACGA
T27G7-BsrDI*	dCAPS	<i>Bsr DI</i>	TTGGACTGGATCTTGATTG	CCATATAAAAAACAGAGACTAAG
T27G7-RsaI*	dCAPS	<i>Rsa I</i>	GGCAATGAGTTGGTTCGTGTC	GCAGCAAGCAGACATTCACAC
T27G7-AclI	dCAPS	<i>Acl I</i>	TGGGCACATTTCTCACATT	GGAGAATAAACTAGAAATGAAG
T6D22-MnII*	dCAPS	<i>MnII</i>	CCGCCTGAGAACACACCCAAC	GATAGTCTTTATTGTGCGGTG
T6D22-MaeIII*	dCAPS	<i>Mae III</i>	TGGCAGCGTTTTCGATTCT	TGTTCTCGCCGCATACCTG
F22O13-AciI*	dCAPS	<i>Aci I</i>	ATGACTCGCTGCAGCTGGAATA	CATAACAAACAGAAACGGAAGA
F22O13-FokI*	dCAPS	<i>Fok I</i>	GGAGAGAGTGAGACCCACGTG	TTTTGAAGAGTATGTTTAGCC
T7I23	SSLP	-	CATGCACGTACGATTTGTTTAAC	GTGTCCTTTTTTCTCAACGATG
ATEAT	SSLP	-	GCCACTGCGTGAATGATATG	CGAACAGCCAACATTAATTCCC
nga63	SSLP	-	AACCAAGGCACAGAAGCG	ACCCAAGTGATCGCCACC
F14L17	INDEL	-	GAAATGCAGTTACCCTTAAT	TATATATTCTACAGAGCTGT

Tabla 3. Marcadores moleculares utilizados en la zona de ligamiento de la mutación *esd7*. * Marcadores desarrollados durante este trabajo.

Para identificar estos polimorfismos se diseñaron parejas de cebadores separados unos 100-200 pb, en las regiones genómicas donde existen estas inserciones o deleciones. Posteriormente se separan los fragmentos generados en un gel de agarosa del 4%, ya que a esta concentración de agarosa se distinguen fragmentos de entre 100-200 pb y que difieren como mínimo en 10 pb.

Alelo	TIPO	ENZIMA	DIRECTO	REVERSO
<i>fve-1</i>	CAPS	<i>Xmn I</i>	CAACCTACAAGAATCGCCAGC	ATCATGCGCTTTTTCAACCTG
<i>fca-1</i>	CAPS	<i>Mse I</i>	CTCTTCACAGTCCACAGGGTCTG	TGTTGCATCTTTGTAGCGGTT
<i>spy-5</i>	dCAPS	<i>Rsa I</i>	CGGAATATGTGGAAAAAGTAGT	ACGCTGACTCTTGATGGTCC
<i>ga1-3</i>	SSLP	-	SILVESTRE: TTTGCGCCAACACACAAACCTT MUTANTE: TGTATGCACGTAAACGATCAAT	SILVESTRE: AAGCTTCGAACTCCAGGTTCTA MUTANTE: TTTCTTCATACCACCTGCGTTC
<i>soc1-1*</i>	dCAPS	<i>Taq I</i>	CCGTTTAGAAGCTTCGAGTTGTT	GCCAGCTTTTGATCAGATGTTTC
<i>ft-1*</i>	dCAPS	<i>Taq I</i>	AGTTTTCTACAATTGTCAGAGGGA GAGTGGCTTCG	AGGCATCATCACCGTTCGTTACT CGTATC
<i>gi-3*</i>	dCAPS	<i>Mnl I</i>	AAAGCAGCAGCAGCAGTTGTCCCT	CAAATGAGTGAACCAAGCATT
<i>co-2</i>	dCAPS	<i>Nsp I</i>	AACGACATAGGTAGTGGAGAGAAC	CGAAGCAACCTCCTTGGC
<i>tfl2-1*</i>	dCAPS	<i>Dde I</i>	GTAACGGTGCAGGATGTTCC	CCGCTTAGCACCTATGAAACG
<i>fas2-1*</i>	dCAPS	<i>Mnl I</i>	GCTTTCCTGCTTCTCACAA	ACATACTTTGCTAAGGGACC
<i>icu2-1</i>	secuencia	-	TCTGTGCAGGGTAATGCTAGC	CTTCTGCTCAGTACGTTTCGTG
<i>icu2-1*</i>	dCAPS	<i>Mnl I</i>	ATTCATCCGGTGGTGTCCCT	TCGGAAATTTGCTGGAGTGA
<i>esd7-1*</i>	dCAPS	<i>Dde I</i>	TTCACATTTTCTCCAGAATCTA	GCTCACCATAATCTGCTAACG
<i>til1-4*</i>	dCAPS	<i>BseR I</i>	GATGAGGTTTTACGTAAGAGG	GGTCAGCTTGATTTTTGTTG
<i>ebs-1</i>	secuencia	-	TGGACTGCTCTTTCACGGTTTTTC	GGAGCCAGCTTCCGTAGG

Tabla 4. Marcadores moleculares de alelos mutantes. *Marcadores desarrollados durante este trabajo.

Los dobles mutantes analizados en este trabajo se obtuvieron mediante el cruzamiento de mutantes simples y posterior selección de la doble mutación en la generación F2, usando marcadores moleculares (tabla 4) y/o análisis fenotípicos. Para confirmar que las plantas seleccionadas eran dobles mutantes, se comprobó que en la generación F3 no se producía segregación de los parentales.

14.3. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias.

Para secuenciar las pautas de lectura abierta delimitadas en la zona del mapeo cromosómico que se describen en los resultados, se diseñaron parejas de cebadores que amplificaban fragmentos contiguos de en torno a 500 pb y que solapaban con los fragmentos flanqueantes unos 100 pb los unos de los otros, para así cubrir la totalidad de la región codificante del gen predicho, incluidas las regiones 5' y 3' UTR. Las secuencias para realizar

dichos diseños (tabla 5), fueron obtenidas en las bases de datos de TAIR (The *Arabidopsis* information resource).

LOCUS	SECCIÓN	DIRECTO	REVERSO
<i>At1G08280</i> : Syalil transferasa	1-2	GCTTCCGACTTTCTTTCTTTC	AGGTTTCATAAGCTCTTCTACGA
	3-4	TCGTTCTTCTCAGGCTTATC	CACGATTCTAGCACACATGAC
	5-6	TTGTGTAAACCATCTCATCG	ACAAAACGACACTCTTGCC
<i>At1G08290</i> : Wip3	1-421	GTGTGGAGGTAGAGAGAGAGAGAG	CGAAAGTTATATCAGAGCCATCC
	300-820	GAAGAGAATAAGGATGATGTGGTT	CTATGATAATGGCAAAGGTAAAG
	631-1197	CAATAGGTACAATAACATGCAGAT	CATATGCAGCAAAATTCTCAC
	1150-1724	CCTTCTATTGATCATACACTTCTTT	CGAACTAAAGTTGGGACGAAAG
	1666-2187	CATAGGATTCTCTCCTTTACCATT	TGGATTGTGCCTTTCAACGA
	2143-2581	GTGGGGACATGGATCTGAGT	AGTCTCCCCGGTGTATCTAA
	338-920	GCAGAAAAGAGACTAATCAAGAAG	CTACAACATACAATCAGAAACCAAG
	825-1429	CAAAATGCGACCCTCTAATCAAG	CTAACTACATCATTTATCACGTGG
	1329-1956	CCAACTCCCTAACTTCCTCTATATC	CAATGTAACCTAAGGAGGAATTGACC
	1856-2512	CTCCATTCTTTCTCTTGACTTT	CCTTTTTTGGATCTGTGTATG
	2401-3000	CTCTCTCTCTCCTTGTCATTTG	ATGTATAGGAAATGATGATGATG
	2916-3525	GACATTGCAGAGGAAGGCTAC	GCACATACGCCTGCTCAAACC
	3431-4041	CGTATAAGTTCCGCATTCTTG	GAGCAATGTAACCGTCAACGA
	3940-4541	GGCTAGAGGATGATAACCGGC	CGGCGAGAGTATCGATGAGAG
<i>At1G08320</i> : bZIP21	4426-4943	GACGGAGCAACAACCTGATGGG	GCCAGCACATACGTTTGTTT
	4790-5448	GGTTTATAGTTAGAGAGGAATTCG	GCTGGTGAACGGTCTGCTG
	5262-5785	CCCATTAGCCCACCAAGGTAG	CGACAGACAATGAACTTGCC
	1-2	CAAGGAGAGTGGGTCAGAGT	GCGGTATTAGTTGAAGTTGG
	3-4	TCTTAGGCTTCGTAGCAACC	CGAGTACGTTAGACAAGCGG
<i>At1G08270</i> : AAA-ATPase			

Tabla 5. Cebadores utilizados en la secuenciación de loci que pudieran estar implicados en procesos de desarrollo y localizados en la región genómica circundante al locus *ESD7*.

Para la secuenciación de la región genómica correspondiente al gen *ESD7* se diseñaron dos parejas de cebadores de forma similar a la anterior y que cubrían la mitad de los exones del gen. Mediante el uso de PCR se generaron fragmentos que en conjunto contenían la mitad

de la secuencia codificante de dicho gen. Los cebadores empleados para *ESD7* se muestran en la tabla 6:

EXON	DIRECTO	REVERSO
25/26	AAGTGTCGAGAAATTTCAAG	GGCGCTGAAAGAAATCATA
27/28	GCATCTTTCTCAGCTAGTCT	GAGGTCATACAAGTCGTTAGA
29	GTTATTACCATTCTGCTGC	ACTTCAGGTGAACAAATACCA
30	CCAAGGATGGCTTGAAGT	CAACCCCTTCCACAACCACCC
31/32	TGCAACCATATAAAGCTGTC	CCCAGACACCATACACAAG
33	GTTGGTTATCATGCATGTTG	CCTTCCTTCAACTTAACTCC
34/35	GGTTTCAATTATCCAAGCC	AACATTAAACTGGCTACACTTC
36	GAGAGGTCATGTCAGGTCATG	CCTCCGATCCAACCACTG
37/38	GTATGTGGGTTTGTTGCA	TCTGACACCCAAAGGACCTG
39/40	GCTTTTGCTCTGTGTGTGCA	ATCCCATAAAACCGCTCC
41/42	TACCTAATCATCAGTGCTTTT	TTCAGACAGAAAAGCAAGGA
43	CCTTGCCGGATTATACCTGT	TGAGTGCCAGTAGTGAACCG
44	CAGGTTTCTTGATCTTGCCT	CAAAAAAGAAATGAGGAGAC
45	GCCAATTCGCTTGATCTAC	AAACAACGCTTCAGTGGAC
46/47	GGCGTATTCACAAGTCTTCTG	CGTAGCCAATCACAAGAATG
48	CAGTAGTAAGCAGTAAGACAGC	GTAACCTATGCACAAATCAA

Tabla 6. Cebadores utilizados en la secuenciación de la región genómica de *ESD7*.

Las reacciones de amplificación de PCR obtenidas para cada par de cebadores y para cada DNA genómico de la planta mutante y silvestre, o bien, los insertos de las construcciones plasmídicas, fueron cargados en geles de agarosa 0,8% en TBE (p/v). Los fragmentos obtenidos la por separación electroforética, se cortaron en forma de bloques de gel para separarlos de los cebadores residuales de la reacción. La purificación del correspondiente fragmento, fue llevado a cabo en columnas de separación (QIAquick GEL Extraction kit QIAGEN, Alemania; GeneClean Q-BIOgene, MP Biomedicals USA) y secuenciados por el servicio de secuenciación de la Unidad de genómica del Parque Científico de Madrid del la U.C.M y por el Servicio de secuenciación de Secugen, S.L.

Las secuencias así obtenidas, se analizaron con los programas informáticos Chromas 1.45, GENE RUNNER 3.02 y en el programa de comparación de secuencias (Blast 2 sequences) de la página Web del NCBI.

15. Obtención de construcciones plasmídicas:

15.1. Complementación de la mutación *esd7*.

El clon originario que contenía el locus *esd7*, denominado T23G18, estaba contenido en pBeloBAC11 y fue obtenido en el DNA Stock Center of *Arabidopsis* Biological Resource Center en la Universidad del estado de Ohio (Columbus, USA). Los vectores plasmídicos que se han usado en la obtención de las construcciones para complementar la mutación *esd7* son del tipo pCAMBIA (pCAMBIA 2300, CAMBIA, Australia). La clonación se llevó a cabo tras la digestión del DNA genómico del BAC T23G18 con la enzima de restricción Sal I y después de aislar y purificar los fragmentos de restricción correspondientes, se clonaron en el vector binario pCAMBIA 2300. Este vector binario posee un origen de replicación para *E. coli* y *A. thumefaciens* y se usa para la generación de plantas transgénicas mediante la selección de transformantes en medio selectivo con antibióticos.

15.2. Análisis del promotor de *ESD7* en plantas transgénicas portadoras de la construcción *ESD7::GUS*.

Los cebadores utilizados para amplificar un promotor de 1.1 Kpbs a partir de DNA genómico fueron los que se muestran en la tabla 7.

CONSTRUCCIÓN	DIRECTO	Enzima	REVERSO	Enzima
pBSKII_prom_ESD7	GCGGTCGACTGACGATGCTG TGGAACCAAC	Sal I	CGCGGATCCTCGATTATCTCC GCTCATTTTG	Bam H1

Tabla 7. Cebadores utilizados para la amplificación de un promotor de 1.1 Kpbs de *ESD7*.

Estos cebadores poseían dianas de restricción diseñadas para poder clonar el fragmento resultante de la amplificación en un pBluescript II KS, secuenciarlo y poder posteriormente volver a clonarlo en el vector pBI101.1 (pBI101.1_prom_ESD7), de forma que se pudiera fusionar transcripcionalmente el gen delator GUS contenido en este vector. De forma análoga al anterior apartado, pBI101.1 es un vector binario que posee un origen de replicación para *E. coli* y *A. thumefaciens* y se usa para la generación de plantas transgénicas mediante la selección de transformantes en medio selectivo con antibióticos.

15.3. Complementación bimolecular de fluorescencia.

En la tabla 8 se muestran los cebadores utilizados para amplificar los cDNAs tanto del dominio c-terminal de *ESD7* (AtPOL2A) como de *DPB2*. El DNA molde utilizado para clonar el sitio de interacción del *ESD7* (AtPOL2A) con *DPB2* fue el contenido en los clones POLA3-AD

(cDNA contenido en el vector pGADT7) y DPB2-BD (cDNA de AT5G22110 contenido en el vector pGBKT7) aportados por el Dr. Martine Devic (Laboratoire genome et developement des plantes, CNRS-IRD-UP, France). Los fragmentos así obtenidos fueron clonados en pGEMT y secuenciados y los cebadores poseían dianas de restricción diseñadas para poder clonar posteriormente los fragmentos POLA3 (1700 pb) y DPB2 (1800 pb) en los vectores pSpyce y pSpyce respectivamente, fusionando traduccionalmente el dominio C-terminal de ESD7 al dominio C-terminal de la YFP o DPB2 al dominio N-terminal de la YFP, contenidos en cada vector. Una vez conseguidas las construcciones correspondientes, se procedió a transformar *Agrobacterium* con las mismas e infiltrar transitoriamente los cultivos correspondientes en plantas de *Nicotiana*, junto con otra construcción que expresa un inhibidor del silenciamiento (*pBIN::p19*).

CONSTRUCCIÓN	DIRECTO	Enzima	REVERSO	Enzima
pSpyce_POL2A	GCGCGGATCCATGTTAGTAT TCCCTGGAGCGTA	BamH I	GAGTTCCCGGGATAGCTAGG GCCATATATGATCC	XmaI
pSpyne_DPB2	GCGCGGATCCATGAGCAGC ACCAGTCAGAA	BamH1	CGCGCTCGAGCAAAGCAGAG AGTTCTGACTT	Xho I

Tabla 8. Cebadores utilizados para la amplificación de los cDNAs del dominio C-terminal de POL2A y DPB2.

16. Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

La transformación de plantas de *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante el método de infiltración descrito por Clough et al. (1998). Para ello las plantas T0 se cultivaron tal como se describe en el punto 1, en condiciones de DL hasta la aparición de la inflorescencia principal. Estas plantas T0 fueron sumergidas durante 5 minutos en una suspensión de células de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 que portan la construcción. Posteriormente fueron llevadas de nuevo a la cámara climatizada con el fin de obtener las semillas T1. Estas semillas se esterilizaron y sembraron en alta densidad en placas Petri con medio GM selectivo para así obtener las plantas transgénicas resistentes que posteriormente fueron transplantadas a tierra.

Para obtener líneas T3 homocigotas con una sola inserción, se seleccionaron sólo aquellas plantas T2 que presentaban una segregación 3:1 de resistentes al antibiótico o herbicida y se llevaron a la siguiente generación las plantas que eran resistentes. Posteriormente, viendo la segregación en la T3, se obtuvieron plantas homocigotas para la inserción en aquellas placas en las que no segregaban plantas sensibles.

17. Infiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium*.

Las plantas de *Nicotiana* utilizadas fueron germinadas y cultivadas en el invernadero prestando especial atención a la temperatura, ya que a mayor temperatura mayor es el nivel de silenciamiento. La agroinfiltración se realizó en la 3ª semana post-germinación en todas las

hojas de la planta (las plantas en estas condiciones poseen entre 4-5 hojas, sin contar los cotiledones). Las hojas que mejor expresión transitoria mostraron fueron las más jóvenes.

A partir de los stocks de células de *Agrobacterium tumefaciens* (previamente transformadas con las construcciones de interés) se hicieron preinóculos en medio selectivo durante toda la noche. Posteriormente se inoculaba 50 mL de medio selectivo en el volumen necesario para dejar el cultivo a una D.O de 0,2 y se dejó en agitación a 28°C hasta que alcanzara una D.O de 0,6-0,8. Después se procedía a la inducción del cultivo, centrifugándolo a 4000 r.p.m durante 20 minutos y resuspendiendo el pellet en 10 mL de solución de inducción (10 mM Mg₂SO₄, 10 mM MES, 150 µM Acetosiringona) y se dejaba induciendo el cultivo durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Durante la inducción se medía la densidad óptica de la suspensión bacteriana para infiltrar la misma cantidad de cultivo. La suspensiones bacterianas así obtenidas se mezclaban equivolumétricamente junto con la que contenía el inhibidor de silenciamiento y se infiltraban en el envés de la hoja de *Nicotiana* mediante una jeringuilla, calculando en todo momento el volumen de suspensión utilizado por cada planta.

La recolección puede realizarse a partir de los 2 dpi, siendo óptima entre 3-4 dpi (si no se usa un supresor de silenciamiento como el p19). Los niveles de expresión transitoria aumentaron espectacularmente (entre 10-50 veces) utilizando un supresor de silenciamiento. El procedimiento que se utilizaba para incluir el supresor de silenciamiento fue similar al utilizado en la mezcla de cada preinoculo de *Agrobacterium*, así se agregaba un cultivo inducido de *Agrobacterium*, que expresa el supresor de silenciamiento, en la misma mezcla a agroinfiltrar.

18. Métodos histoquímicos.

18.1. Fijación de tejidos.

Para la fijación y conservación de los tejidos que posteriormente iban a ser sometidos a la inclusión en parafina, las hojas de las plántulas de 10 días de edad fueron cortadas y sumergidas en una solución de fijación a 4°C (glutaraldehído 1,5% (v/v), paraformaldehído 0,3% (v/v), buffer PIPES 25 mM, 0,1%, tween 20 (v/v)). Después se sometieron a vacío durante 10 minutos, teniendo la precaución de que se formen burbujas lentamente sin que la muestra llegue a burbujear. Posteriormente se cambiaba la solución de fijación y se dejaban 24h a 4°C con agitación.

18.2. Inclusión en parafina.

Una vez fijadas las muestras, estas se sometían a tres lavados de 20 minutos con un buffer PIPES 25 mM en agitación suave. Después, las muestras se deshidrataban por medio de una serie de lavados con diferentes soluciones de etanol en PIPES 25 mM (30%, 50%, 60%, 70%,

80%, 90% y 100% (v/v)) de 30 minutos cada uno en agitación. El siguiente paso era embeber el tejido en Xilol; para ello, las muestras se trataban sucesivamente con cambios de 30 minutos en etanol: xilol (3:1, 1:1, 1:3, (v/v)). Tras esta serie las muestras se sumergían en Xilol 100% durante 1h. Transcurrido este tiempo, el xilol se eliminaba y se añadía un volumen pequeño de Xilol, lo suficiente como para cubrir el tejido y se añadían lentejas de parafina (Paraplast X-tra, Oxford Labware, Fischer Scientific) hasta rellenar completamente el vial y se dejaba incubando a 56°C toda la noche para permitir que la parafina se fundiera completamente. Al día siguiente, esta mezcla se retiraba y se añadía parafina fundida, repitiendo este proceso 3 veces al día durante 2 días. Por último se formaban los bloques de parafina vertiendo el contenido de los viales en unos moldes plásticos preparados y dispuestos sobre una placa térmica a 45°C donde se orientaba la muestra, dejándola posteriormente enfriar.

18.3. Corte y tinción de muestras.

Para la obtención de cortes finos de 6 μm se utilizaba un microsoma. Los cortes se disponían sobre una gota de agua depositada en un portaobjetos; después, por calentamiento a 42°C, el agua se evaporaba y la lámina de parafina quedaba adherida al portaobjetos. Para la tinción de estas secciones el primer paso consistía en hidratar las muestras pasando los portaobjetos por las siguientes soluciones: etanol 100% (1' dos veces), etanol 95 % (v/v) (30''), etanol 85 % (v/v) (30''), etanol 70 % (v/v) (30''), etanol 50 % (v/v) (30''), etanol 30 % (v/v) y agua (5'). Una vez hidratados, los cortes se teñían sumergiéndolos durante 5 minutos en una solución de azul de toluidina. El siguiente paso era volver a deshidratar las muestras, para ello se utilizaba nuevamente la serie de soluciones alcohólicas pero en sentido inverso. Cuando las muestras estaban en etanol absoluto se pasaban por Xilol 100% durante 30 seg. Sin dejar secar, se añadía sobre la muestra una gota de medio de montaje (Permount, F SP15-100 Toluene Solution, Fisher Scientific) y sobre ésta el cubreobjetos, dejando secar la preparación varios días.

18.4. Ensayos histoquímicos de β -glucoronidasa.

La actividad del gen GUS en plantas transgénicas se reveló mediante incubación a 37°C de tejidos o plántulas en solución GUS (100mM de NaPO_4 (pH 7.2), 2,5 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-glucoronidasa, 0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.5mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y 0.25% de Triton X-100) durante un tiempo que comprendió entre 1-24 horas dependiendo del experimento. Transcurrido este tiempo, se eliminaba la solución y las plantas se trataban con varios lacados de etanol 70% (v/v) hasta eliminar totalmente la clorofila de los tejidos. Para la observación de estas plantas se utilizaba una lupa binocular (Leica S6E).

19. Análisis de expresión

19.1. Extracción de ácidos nucleicos, cuantificación, electroforesis, blots y análisis de secuencias.

19.1.1. Extracción de RNA.

Para la extracción de RNA total se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen-Gibco) o se utilizaron kits de extracción de RNA con columnas microspin (RNAqueous, Ambion, Applied Biosystems USA; Rneasy Mini Kit QUIAGEN, Alemania; EZNA Plant RNA Kit, Omega Bio-tek, USA) siguiendo el protocolo del recomendado por el fabricante, a partir de material vegetal congelado y posteriormente pulverizado en mortero con N₂ líquido de forma similar a como se ha detallado en el caso del DNA. Además, se realizó un tratamiento en columna durante 15 minutos a temperatura ambiente con DNase, para eliminar cualquier rastro de DNA genómico en cada una de las muestras. La concentración de RNA total obtenido se cuantificó mediante espectrometría (Sambrook et al., 1989), en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA).

Para comprobar la integridad de las muestras de RNA total se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,2 %, en presencia de formaldehído/formamida (Sambrook et al., 1989). El tampón empleado como electrolito fue MOPS 1X (Sambrook et al., 1989). Las muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 65°C antes de cargarse en el gel de agarosa, diluidas en un tampón de carga compuesto por MOPS 10X, formaldehído, formamida y bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989).

19.1.2. Reacción de la transcriptasa reversa seguida de amplificación del cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para la síntesis de cDNA total se utilizó el kit Super-Script™ First-Strand synthesis for RT-PCR (Invitrogen, California USA) usando aproximadamente entre 0,5 y 1 µg de RNA total. El cDNA así resultante, se diluía 1:3 en Agua miliQ y se cuantificaba el DNA en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA), para poder diluir las muestras hasta una concentración de 100 ng/ µL. De esta forma se tomó 1 µL para cada reacción de PCR de 20 µL de volumen final. Las condiciones de amplificación se ajustaron en cada caso con el fin de no saturar el resultado de la reacción tal y como se indica en la tabla 9 junto con los cebadores empleados para cada gen. Como control de carga se realizó en cada caso una reacción de PCR con cebadores que nos permitían amplificar un fragmento de cDNA del gen de la *UBIQUITINA 10 (UBQ10)*.

SONDA	PROGRAMA	DIRECTO	REVERSO
<i>UBQ10</i>	94°(2') [94°(1') 67°(1') 72°(30'')x20 72°(5') 4°(∞)	GATCTTTGCCGGAACAATTG GAGGATGGT	CGACTTGTCTATTAGAAAGAAAG AGATAACACG
<i>CO</i>	94°(2') [94°(30'') 60°(30'') 72°(30'')x28 72°(5') 4°(∞)	CTCCTCGGCTTCGATTTCTC	CATTAACCATAACGCATACATTT C
<i>FT</i>	94°(5') [94°(1') 65°(1') 72°(35'')x30 72°(1') 4°(∞)	ACAACCTGGAACAACCTTTGGCA ATG	ACTATAGGCATCATCACGGTTC GTTACTGG
<i>SOC1</i>	94°(5') [94°(30'') 58°(30'') 72°(30'')x30 72°(7') 4°(∞)	GGCATACTAAGGATCGAGTCAG CACCAAAC	ACCCAATGAACAATTGCGTCTC TACTTCAG
<i>TSF</i>	94°(5') [94°(30'') 60°(30'') 72°(15'')x30 72°(5') 4°(∞)	GAGTCCAAGCAACCCTCACCAA	CACAATACGATGAATTCCCGAG
<i>MAF1</i>	94°(5') [94°(30'') 65°(30'') 72°(1')x32 72°(5') 4°(∞)	ATGGTCTCATCGACAAAGCTCG AC	CTCTTAATTATGAATCAGGCTTT GAG
<i>MAF2</i>	94°(5') [94°(30'') 69°(30'') 72°(1')x28 72°(5') 4°(∞)	GGGTAGAAAAAAGTCGAGATC AAGCGA	CTTGAGCAGCGGAAGAGTCTCC
<i>MAF3</i>	94°(5') [94°(30'') 65°(30'') 72°(1')x35 72°(5') 4°(∞)	GAAGAAAAAAGCAAACACATT TTGGGTCC	AAGAACTCTGATATTTGTCTACT AAGGTAC
<i>MAF4</i>	94°(5') [94°(30'') 69°(30'') 72°(1')x35 72°(5') 4°(∞)	ATTAGGTCAGAAGAATTAGTCG GAGAAAAC	CTTGATGACTTTTCCGTAGCA GGGGGAAG
<i>MAF5</i>	94°(5') [94°(30'') 69°(30'') 72°(1')x35 72°(5') 4°(∞)	GGGGATTAGATGTGTGCGGAAG AGTGAAG	GATCCTGTCTTCCAAGGTAACA CAAAGG
<i>FLC</i>	94°(5') [94°(30'') 60°(30'') 72°(1')x30 72°(5') 4°(∞)	TTAGTATCTCCGGCGACTTGAA CCCAAACC	AGATTCTCAACAAGCTTCAACAT GAGTTCCG
<i>ATBRCA1</i>	94°(5') [94°(30'') 55°(30'') 72°(20'')x28 72°(5') 4°(∞)	CCATGTATTTTGAATGCGTG	TGTGGAGCACCTCGAATCTCT
<i>RAD51</i>	94°(5') [94°(30'') 55°(30'') 72°(20'')x28 72°(5') 4°(∞)	CGAGGAAGGATCTCTTGCAG	GCACTAGTGAACCCAGAGG
<i>ATGR1</i>	94°(5') [94°(30'') 55°(30'') 72°(20'')x28 72°(5') 4°(∞)	GAAGGAGCAGACAAAGTGAG	GGTGAGATGGAAGTGATAGG
<i>KU70</i>	94°(5') [94°(30'') 55°(30'') 72°(20'')x28 72°(5') 4°(∞)	CTTAAGACTGCTGGGGTTC	GGGTCATCGCCATAAATC
<i>KU80</i>	94°(5') [94°(30'') 55°(30'') 72°(20'')x28 72°(5') 4°(∞)	TTGGTTTTGGTGCTCGATG	GTGGACTATCAACATTCAGT
<i>AG</i>	94°(5') [94°(30'') 55°(30'') 72°(20'')x35 72°(5') 4°(∞)	CCGATCCAAGAAGAATGAGCTC TT	CATTTTCAGCTATCTTTGCACGA A
<i>SHP1</i>	94°(5') [94°(30'') 58°(30'') 72°(30'')x30 72°(5') 4°(∞)	GGAGGAAGGTGGGAGTAGTC	TCTCTGCCACTAACAGCTCA
<i>AGL24</i>	94°(5') [94°(30'') 55°(30'') 72°(30'')x30 72°(5') 4°(∞)	GGCGAGAGAGAAGATAAGG	GATCCCCGTTTCTCAAGTG
<i>SEP1</i>	94°(5') [94°(30'') 58°(30'') 72°(20'')x30 72°(5') 4°(∞)	AGTCATCATATGGGAGGAGG	CCTGAGCTTGGGTTGTCTG
<i>SEP2</i>	94°(5') [94°(30'') 56°(30'') 72°(20'')x30 72°(5') 4°(∞)	GGAAAGGTATCAGAAGTGATG	TATATGGTGATGTCTCACGC
<i>SEP3</i>	94°(5') [94°(30'') 55°(30'') 72°(30'')x30 72°(5') 4°(∞)	GGGAAGAGGGAGAGTAGAA	GTGTCCTGAGAGCTCTGATC
<i>ESD7</i>	94°(5') [94°(30'') 60°(30'') 72°(30'')x32 72°(5') 4°(∞)	CCAAGGATGGCTTGAAGT	CAACCCCTCCACAACCACCC

Tabla 9. Programas de PCR y cebadores utilizados en los análisis de expresión de cada uno de los genes descritos.

19.1.3. Marcaje radiactivo de sondas e hibridación de ácidos nucleicos.

Los fragmentos de DNA utilizados como sonda para analizar la expresión del mensajero correspondiente, se obtuvieron por digestión con enzimas de restricción o por amplificación mediante PCR a partir de los plásmidos donde están clonados los cDNAs de cada gen analizado. Estos fragmentos de DNA fueron purificados mediante columnas de QIAquick (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las sondas de DNA se marcaron con 40 μ Ci de α - 32 P-dCTP (Amersham-Pharmacia) mediante el método de extensión a partir de cebadores aleatorios desarrollado por Feinberg y Vogelstein (1983). Para ello se utilizó el sistema Rediprime II DNA Random Prime Labelling system (Amersham-Pharmacia). Después del marcaje, los nucleótidos no incorporados al DNA se eliminaron mediante el paso por columnas Microspin S200 HR (Amersham-Pharmacia). Las hibridaciones de ácidos nucleicos se llevaron a cabo en tubos de vidrio conteniendo de 10 a 15 mL de solución de hibridación (Sambrook et al., 1989). Las membranas se prehibridaron a 65°C durante 2 horas y posteriormente se les añadió la sonda desnaturalizada, incubándose en agitación suave durante toda la noche. Tras la hibridación, las membranas se lavaron en condiciones cada vez más astringentes, comenzando con SSC 2X, 0,1% SDS hasta llegar a 0,2X SSC, 0,1% SDS. Todas las incubaciones de lavado se realizaron a la misma temperatura a la que se realizó la hibridación durante 20 minutos. Finalmente las membranas fueron expuestas a películas radiográficas Hyperfilm (Amersham) entre pantallas intensificadoras a – 80° C, durante el tiempo necesario para la visualización de la señal.

20. Ensayos de expresión de proteínas, purificación y pull-down.

El cDNA de *TFL2* fue aportado por el grupo del Dr. Del Pozo y estaba contenido en un vector pGEX. Esta construcción fue expresada en *Escherichia coli* BL21 Rosetta y las proteínas resultantes fueron purificadas mediante bolas de glutation 4B sefarosa, manteniéndose unidas en las bolas como proteína de fusión GST-TFL2 o GST solas. La construcción aportada por el Dr. Martine Devic POLA5-AD (cDNA de la primera mitad del dominio C-terminal de ESD7 contenido en el vector pGADT7) fue utilizada para la reacción de transcripción-traducción *in vitro* utilizado el sistema TNT Quick Coupled Transcripción-Traducción en presencia de [35 S] metionina. Para el ensayo de pull-down, se utilizó 1 μ g de GST o buffer (20mM TRIS-HCl, pH 7.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol, 0.01% Nonidet P-40) con 15 μ L de la reacción TNT y lavamos con buffer de unión suplementado con 500mM de NaCl. Las muestras fueron hervidas con buffer Laemmli y analizado mediante SDS-PAGE.

21. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

Aproximadamente 300 mg de material vegetal fresco se embebieron en buffer A (400 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH=8.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% formaldehído), aplicando vacío durante 15 minutos; posteriormente se añadió glicina hasta una concentración final de 100 mM, dejando 5 minutos más una vez añadida. Este material vegetal fijado se lavó dos veces por 10 minutos con una solución de PBS (PBS 1X, 1 mM PMSF, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL pepstatina A) y una vez retirada dicha solución se procedió a congelar en N₂ (l) triturando el material vegetal hasta conseguir un polvo fino sin dejar que este se descongele. El material congelado se resuspendió entonces en 1 mL de buffer de lisis (50 mM HEPES pH=7.5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% triton X-100, 0.1% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 10 mM butirato sódico, 1 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL pepstatina A) y se sonicó durante 35 segundos con el propósito de provocar roturas en el DNA que rindieran fragmentos de entre 500-1000 pb. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 13000 r.p.m y sobrenadante se incubó en agitación suave durante 1 hora con 60 µL de DNAss/proteína A agarosa. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las bolas de agarosa a 3000 r.p.m durante 2 min a 4°C y al sobrenadante se le añadieron 10 µL del anticuerpo apropiado (α -acetil H3K9K14 o α -trimetil H3K4), dejándose en agitación suave durante una noche a 4°C, tras la cual se añadieron de nuevo 60 µL de DNAss/protina A agarosa y se dejó incubando durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó 2 min a 3000 r.p.m, se retiró el sobrenadante y el pellet de bolas de agarosa se lavó repetidas veces con varias soluciones durante 5 minutos a 4° C de forma repetida, centrifugando a 4°C durante 2 minutos a 3000 r.p.m, retirando el lavado anterior y procediendo de la siguiente forma: primero se realizaron 2 lavados con buffer de lisis, un tercer lavado con LNDET (250 mM de Lic., 1% Nonidet P-40, 1% deoxicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH=8.0) y por último realizando 3 lavados con TE.

Los complejos se eluyeron con 300 µL de buffer de elución (1% SDS, 100 mM NaHCO₃), al que se le añadió 15 µL de NaCl 5M y se dejó incubando 2 horas a 65°C. Posteriormente se incubó a 45 °C durante 1 hora con 20 µL de buffer ProtK (1 µg/µL proteinasa K; 10 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl pH=8.0) y el DNA resultante se purificó utilizando columnas de separación QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Alemania) acorde al protocolo establecido en dicho kit. Por último, se diseñaron pares de oligos de diferentes zonas genómicas de los loci *FT* y *AG* para utilizarlas como sondas identificativas de cada una de las marcas epigenéticas acetil H3K9K14 y trimetil H3K4 (tabla 10).

LOCUS	REGIÓN GENÓMICA	DIRECTO	REVERSO
<i>FT</i>	Z1	TGTATTAGTGTTGGTGGGTTTGG	AACTCTGCTTACTATAAGAGGGT
	Z2	TCAAATGTCCTGGTTCTATCTACC	ATATCTCCCACTTGGTAGCCAC
	Promotor	CTAGAAACAAAGAAGAAGATCG	TTAAGGACACCCCCAAAT
	Z1	GTTTCTTCTTCTTCTCGTGC	CCCAACAAAGTGAATCTTAG
<i>AG</i>	Z2	AATGTGGAGTTTTAGATTCAGT	TTCACCTTATCACTCTCACTT
	Z3	TCTCTAGCTCTCTTTCTCTCTC	AAGAGTCCCATAAGCTAAT
	Z4	CAAGGAGGTAATTAAGACAAA	CGCTCAATTCCAACCTCT
	Z5	TGGTGTAGATAGATTTATGCAA	TGAGTCAGAAGAAATGCAAC

Tabla 10. Cebadores utilizados en los análisis de las marcas epigenéticas acetil-H3K9K14 y trimetil-H3K4 de diferentes zonas genómicas de los loci *FT* y *AG*.



RESULTADOS

Microscopía electrónica de barrido de la superficie
adaxial de una hoja del mutante esd7-1

22. Aislamiento y caracterización molecular de *esd7*.

22.1. Aislamiento del mutante de floración temprana *esd7-1*.

Con el fin de identificar represores de la transición floral, en el laboratorio se han llevado a cabo diversos rastreos con diferentes poblaciones mutagenizadas de *Arabidopsis*, encaminados a la identificación de mutantes que presenten un fenotipo de floración temprana. En particular, el mutante *early in short days 7-1* (*esd7-1*) (figura 4) se identificó en un rastreo de una población de líneas mutagenizadas con transposones. En *Arabidopsis*, tanto los T-DNA como los elementos transponibles de maíz del tipo activador-disociador (*Ac/Ds*) o del tipo activador-supresor (*En/Sp*) han sido utilizados habitualmente para generar poblaciones mutagenizadas (Feldmann et al., 1989; Long et al, 1993), de tal manera que si el fenotipo del mutante cosegrega con la inserción del T-DNA o con el elemento transponible, posibilita la clonación molecular del gen mutado sin necesidad de llevar a cabo estrategias más costosas en tiempo y esfuerzo como son el cartografiado y la clonación posicional.

Para la generación de la población mutagenizada donde se identificó *esd7-1*, se llevó a cabo el cruzamiento genético de una línea de *Arabidopsis* en fondo genético Ler, portadora del gen que codifica la Transposasa (*Ac*), con otra línea con el mismo fondo genético y portadora de un elemento transponible *Ds*, portador a su vez del gen de resistencia a higromicina (*Hyg*). La finalidad de este cruzamiento era que el elemento *Ds*, en presencia de la actividad transposasa, pudiera movilizarse a diferentes localizaciones del genoma, generándose de esta manera mutaciones allí donde se integrase. La posición del elemento *Ds* de la línea portadora Tn1 fue cartografiada en el cromosoma 1, cerca del marcador *PHYA* (Aarts et al, 1993; Bancroft y Dean, 1993; Feldmann et al., 1989; Koncz et al., 1990; Long et al, 1993; Long et al, 1997; Walbot, 1992); en la generación F1 se produce el evento de transposición del elemento *Ds*, que normalmente se integrará en una posición del genoma cercana al sitio de lanzamiento (Long et al, 1997). Tras la autofecundación de la población F1, se llevó a cabo el escrutinio del fenotipo mutante de interés en la generación F2 resultante y se seleccionó la planta mutante *esd7-1*, con un fenotipo de floración temprana principalmente en condiciones de DC (figura 4).

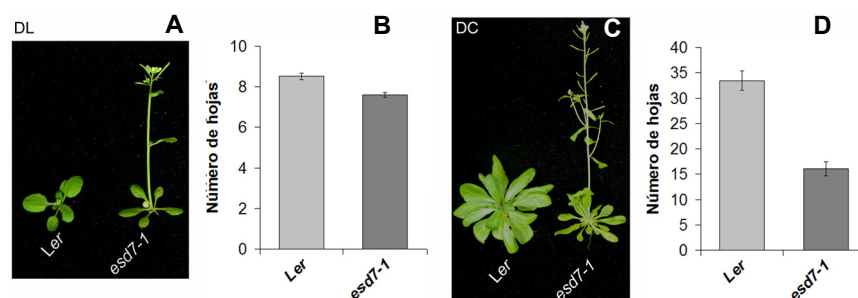


Figura 4. Fenotipo de floración temprana del mutante *esd7-1* en condiciones fotoperiódicas de DL (A) y DC (C). B y D: Cuantificación del tiempo de floración en DL y DC respectivamente, estimado como el número total de hojas, exceptuando los cotiledones, en el momento de la aparición del primer botón floral.

Como se puede observar en la figura 4, en condiciones fotoperiódicas de DL el mutante *esd7-1* desarrolla un total de 8 hojas, en comparación con las 9 hojas que desarrolla la planta silvestre. De forma similar, cuando el mutante *esd7-1* se cultivó en condiciones de DC, desarrolló un total de 15 hojas, mientras que la planta silvestre produjo 33 hojas. Por lo tanto se puede concluir que en condiciones no inductivas, la diferencia de floración entre *esd7-1* y el tipo silvestre es más notoria y que la mutación no provoca una pérdida de sensibilidad al fotoperiodo, ya que las plantas *esd7-1* son más tempranas en condiciones de DL que en condiciones de DC.

22.2. Caracterización a nivel molecular del locus *ESD7*.

22.2.1. Cartografiado y clonación posicional del locus *ESD7*.

Una vez aislado el mutante *esd7-1*, comprobamos a través de un análisis de segregación que la mutación se comportaba como monogénica y recesiva. Como el fenotipo mutante cosegregaba con el gen de resistencia a higromicina, cabía esperar que la mutación pudiera estar señalizada por el elemento Ds; sin embargo, cuando se clonaron y analizaron las secuencias de DNA flanqueantes al elemento transponible, con el objeto de identificar el posible locus afectado por la mutación, se observó que dichas secuencias correspondían al T-DNA original de la línea *Ds*, lo cuál nos llevó a plantearnos una aproximación de cartografiado de alta resolución del locus *ESD7* para poder llegar a conocer su naturaleza molecular. Para ello generamos una población F2 de mapeo, resultante del cruzamiento del mutante *esd7-1* en fondo genético *Ler* con una planta silvestre del fondo genético Columbia, con el objeto de utilizar los polimorfismos genéticos existentes entre estas dos accesiones para determinar la posición de la mutación a nivel genómico. Un cartografiado inicial localizó la mutación en el cromosoma 1, muy ligado a un marcador próximo a *PHYA* (*nga63*), donde estaba el sitio de lanzamiento del transposón. El análisis posterior de más de 5000 plantas de la población de mapeo F2 permitió seleccionar 1267 plantas mutantes recombinantes, con un fenotipo de floración temprana. El análisis llevado a cabo con 19 marcadores polimórficos delimitó la mutación *esd7* entre los marcadores T23G18 *AccI* y T23G18 *Aha I*, en una región genómica de alrededor de 43 Kb (figura 5).

Para identificar el locus *ESD7* dentro del intervalo definido por la aproximación de cartografiado, seguimos dos estrategias complementarias de forma paralela, como fueron la secuenciación de diferentes genes candidatos presentes en dicha región genómica y la complementación del fenotipo del mutante *esd7-1*, mediante transformación genética con vectores binarios tipo *pCAMBIA* portadores de fragmentos genómicos de la región identificada; la priorización de los genes candidatos a secuenciar se hizo atendiendo a aquellos genes que por homología de secuencia codificaran proteínas que pudieran participar en mecanismos de control de procesos de desarrollo. Al no encontrar polimorfismos en la secuencia del mutante *esd7-1* en comparación con el silvestre para los genes candidatos secuenciados, y dada la

escasez de información sobre la función biológica desempeñada por el resto de las proteínas codificadas en esa región genómica, junto con el tamaño considerable de la zona que aún quedaba por secuenciar, decidimos acometer una estrategia de complementación por transformación genética con fragmentos genómicos que cubrían la zona de interés.

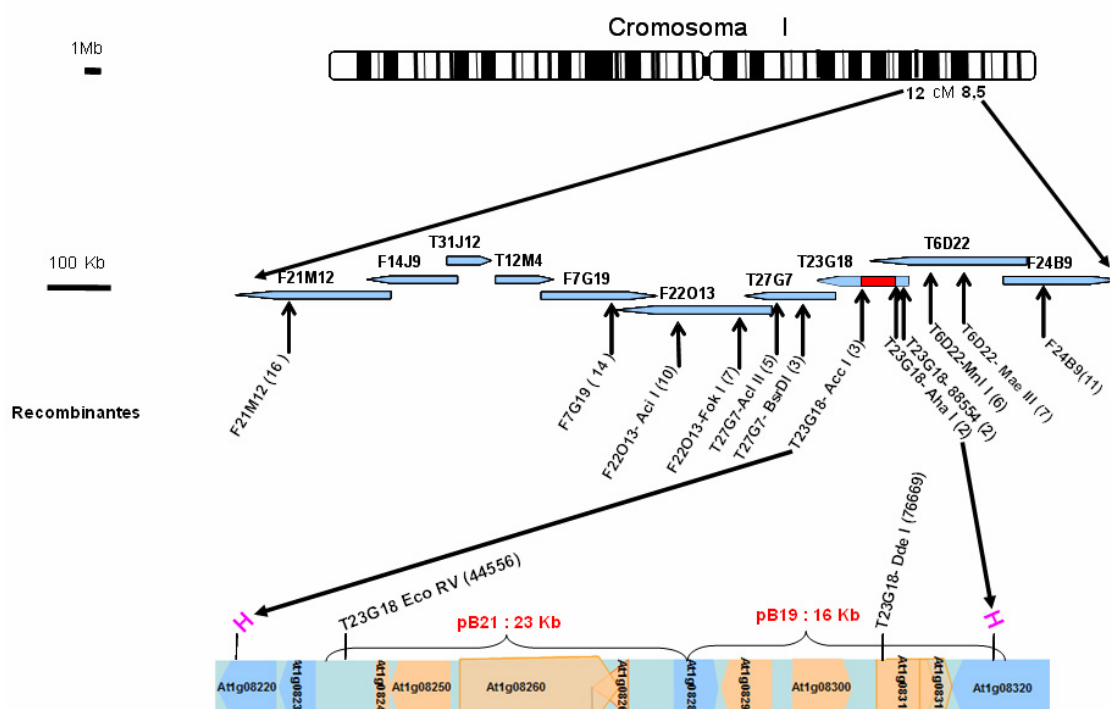


Figura 5. Cartografiado de alta resolución de la zona genómica que contiene el locus *ESD7*. Las flechas azules corresponden a clones tipo BACs presentes en dicha región. Se indican los marcadores moleculares utilizados en el cartografiado junto con el número de plantas mutantes recombinantes para cada uno de los marcadores, que delimitaron la mutación en la zona de máximo ligamiento. En rojo se indica la región del BAC T23G18, donde se localiza el locus *ESD7*, entre los marcadores T23G18 *AccI* y T23G18 *Aha*. pB21 y pB19 son los fragmentos genómicos utilizados en los experimentos de complementación del fenotipo mutante de plantas *esd7-1*. Se indican las distintas ORFs contenidas en cada uno de ellos.

Para intentar llevar a cabo la complementación del fenotipo de floración temprana del mutante *esd7-1*, se subclonaron dos fragmentos de la región de DNA genómico del BAC T23G18, correspondiente a la zona comprendida entre los marcadores que delimitan la posición del locus *ESD7*. Los subclones eran contiguos entre sí y fueron diseñados para cubrir mayoritariamente dicha zona; ambos se introdujeron en plantas mutantes *esd7-1* mediante transformación genética, con el fin de determinar si alguno de ellos rescataba el fenotipo silvestre. El primer subclon, denominado clon 19, de un tamaño aproximado de 16 Kb, comprendía las siguientes cuatro pautas de lectura abierta completas: *At1g08290*, *At1g08300*, *At1g08310* y *AT1G08315*. El segundo subclon, denominado clon 21, poseía un tamaño aproximado de 23 Kb y comprendía las cuatro pautas de lectura abierta *At1g08240*, *At1g08250*, *At1g08260* y *At1g08270* (figura 5). Los resultados obtenidos tras el análisis de las plantas T1 generadas con ambas construcciones indicaron que el locus *ESD7* no estaría contenido en el clon 19, ya que no se obtuvo complementación alguna del fenotipo mutante en 15 líneas transgénicas transformadas con dicho clon genómico. Sin embargo, las líneas

transgénicas obtenidas con el clon 21, complementaron el fenotipo de floración temprano, mostrando un tiempo de floración similar al de las plantas silvestres (figura 6), lo que indicaba que *ESD7* estaría contenido en la región genómica de 23 Kb comprendida en el clon pB21.

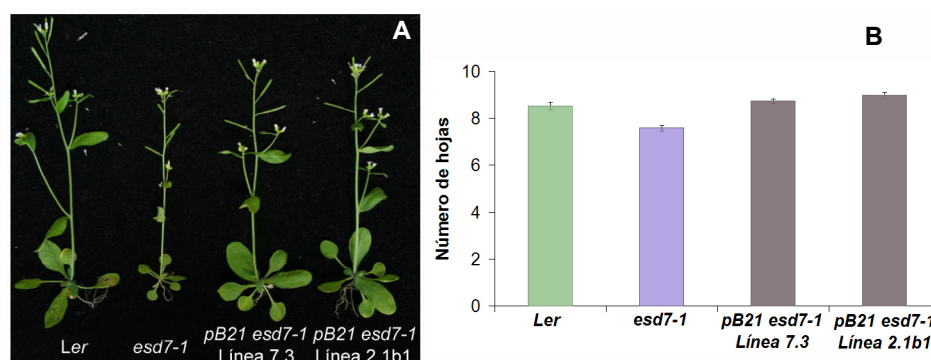


Figura 6. A: Complementación del fenotipo del mutante *esd7-1* mediante transformación genética con el clon genómico pB21. B: En la gráfica se muestra la recuperación del fenotipo de floración silvestre en condiciones fotoperiódicas de DL, de las líneas transgénicas 7.3 y 2.1b1 establecidas en fondo mutante *esd7-1*.

22.2.2. El locus *ESD7* codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa epsilon (ϵ), AtPOL2A.

Con el objeto de identificar el polimorfismo responsable de la mutación *esd7*, secuenciamos en el fondo mutante las cuatro pautas de lectura abierta contenidas en la región genómica del clon pB21. En la pauta de lectura abierta *At1g08270*, que codifica una proteína de la familia AAA de ATPasas que había sido implicada en procesos de desarrollo (Burk et al, 2001), no encontramos ningún polimorfismo en la secuencia de dicho gen en fondo mutante con respecto a la planta silvestre. Por otro lado, comprobamos que la pauta de lectura abierta *At1g08240*, que codifica un hipotético tRNA de un aminoácido, tampoco mostraba polimorfismo alguno. Esto, junto con el hecho de haber obtenido una línea homocigota portadora de una inserción de T-DNA para la pauta lectura *At1g08250* sin un fenotipo de floración aparente, nos llevó a abordar la secuenciación de la región genómica de *At1g08260*, la cual tenía un tamaño considerable (alrededor de 16 Kb); esta pauta de lectura abierta codifica una proteína con una alta homología de secuencia con la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ de eucariotas (AtPOL2a), para la cual ya existía información acerca del fenotipo de letalidad embrionaria descrito en los alelos de inserción de T-DNA en este gen (Tzafrir et al, 2004). Tras su secuenciación, pudimos encontrar el polimorfismo responsable de la mutación *esd7*, consistente en una sustitución de una guanina por adenina en el exón 26 de dicho gen, que produce un cambio aminoacídico de una glicina (G) por una arginina (R) (figura 7).

22.2.3. Aislamiento de alelos portadores de inserciones de T-DNA para *ESD7*.

Tras determinar el polimorfismo responsable de la mutación *esd7*, aislamos diferentes alelos de inserción de T-DNA para el gen *At1g08260* en las colecciones públicas disponibles;

las plantas mutantes homocigotas presentan un fenotipo de letalidad embrionaria, al tratarse de alelos de pérdida de función (figura 7). En concreto, la línea *emb 2284-1* (figura 7, A y B) ya estaba tipificada en los bancos de semillas como una línea con un fenotipo de letalidad embrionaria (Tzafrir et al, 2004). Por otro lado, también hemos podido comprobar este mismo fenotipo para las líneas de T-DNA, *salk_057024*, *salk_1143_A10* y *sail_95_B07*.

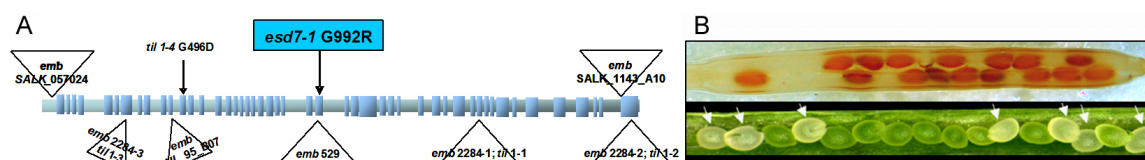


Figura 7. Alelos mutantes de *ESD7/AtPOL2a* (*At1g08260*). **A:** *esd7-1* presenta un polimorfismo en el exón 26 del gen *At1g08260*. Los triángulos muestran la posición de los diferentes alelos de inserción de T-DNA con un fenotipo de letalidad embrionaria. Se indica el polimorfismo presente en la mutación *til1-4*. **B:** Detalle del fenotipo de letalidad embrionaria presente en el alelo *emb 2284-1*. Las flechas indican la presencia de embriones abortados.

De forma paralela a nuestro trabajo, se han publicado dos artículos que también han profundizado en la caracterización de mutantes de pérdida de función de dos de los componentes del complejo de la DNA polimerasa ϵ de *Arabidopsis* (Ronceret et al. 2005), así como en la caracterización de otro alelo viable, denominado *tilted 1-4* (*til1-4*), que al igual que *esd7-1*, es portador de una mutación puntual en el gen *At1g08260* (figura 7; Jenik et al. 2005).

23. Aislamiento de alelos portadores de inserciones de T-DNA para *AtPOL2b*, un gen homólogo a *ESD7/AtPOL2a*.

La comparación de la secuencia del gen *ESD7/AtPOL2a* con el resto de secuencias homologas que codifican la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ , confirmó que en *Arabidopsis* existe otro gen homólogo, *At2g27120*, denominado *AtPOL2b*, y que ambas secuencias pueden considerarse como putativos ortólogos de las secuencias encontradas para la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ en otros organismos tales como *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*, *C. elegans* y *H. sapiens* (figura 9). Nosotros hemos aislado un alelo de inserción de T-DNA para el locus *AtPOL2b* (*salk_092684*, figura 8) y el mutante homocigoto para dicha inserción de T-DNA, además de ser viable, no presenta ninguna alteración fenotípica apreciable.



Figura 8. Aislamiento de un alelo mutante para el gen *AtPOL2b*. El triángulo muestra la posición de la inserción de T-DNA identificada en el mutante *AtPOL2b*.

Ya que la comparación de la secuencia descrita en las bases de datos de *Arabidopsis* para *ESD7/AtPOL2a*, con la reportada por el grupo de la Dra. K. Barton (Jenik et al. 2005) reveló

ciertas diferencias de secuencia entre ESD7/AtPOL2a y los ortólogos de otras especies, determinamos de una forma precisa la secuencia del cDNA y realizamos la comparación de la secuencia de la proteína, estableciendo las correspondencias oportunas con los motivos presentes entre los ortólogos de la misma (figura 9). Debido a la gran longitud del cDNA de ESD7 (~7kb), la clonación de un cDNA de longitud completa fue infructuosa, por lo que fuimos clonando fragmentos solapantes de un cDNA para ESD7/AtPOL2A con oligos específicos, hasta cubrir la totalidad de la secuencia y volvimos a secuenciar las zonas de mayor divergencia de la mitad 5' del cDNA y la totalidad de la mitad 3' terminal del cDNA de ESD7/AtPOL2A, ya que eran las regiones cuya secuencia presentaban los mayores niveles de discrepancia entre los datos publicados (figura 9).

24. Aislamiento de alelos portadores de inserciones de T-DNA para la subunidad reguladora de la DNA polimerasa ϵ AtDPB2.

Aparte de la subunidad catalítica, la DNA polimerasa ϵ posee otras tres subunidades más que difieren en tamaño y en concreto, la subunidad reguladora DPB2 presenta un alto grado de homología de secuencia entre los genes ortólogos desde las levaduras al ser humano (revisado en Hübscher et al. 2000; Shultz et al., 2007). Con el fin de profundizar en la función de este gen de *Arabidopsis*, hemos aislado un alelo de inserción de T-DNA (*sail_1223*) para el locus *At5g22110*, (figura 10) y líneas homocigotas para dicha inserción presentan, al igual que los mutantes de pérdida de función *ESD7/AtPOL2a*, un fenotipo de letalidad embrionaria, el cual fue descrito de forma paralela por varios autores (Jenik et al. 2005; Ronceret et al., 2005).



Figura 10. Aislamiento de un alelo mutante para el locus *AtDPB2*. El triángulo muestra la posición de la inserción de T-DNA identificada en el mutante *Atdpb2*.

Por su parte, en *Arabidopsis* las subunidades AtDPB3 y AtDPB4 parecen estar codificadas por varios miembros de familias multigénicas, y no se ha podido identificar aún los posibles genes ortólogos para ellas.

25. Análisis del tiempo de floración del alelo *esd7-1* introgresado en un fondo genético Col y del alelo *til1-4* en fondo Ws/Ler.

Con el objeto de comprobar que el fenotipo temprano de *esd7-1* se mantenía en un fondo genético Col portador un alelo activo de *FLC*, y poder realizar los análisis genéticos oportunos entre este alelo y otros mutantes de floración en este mismo fondo genético, introgresamos el alelo *esd7-1* en un fondo Col, mediante 4 retrocruzamientos.

RESULTADOS

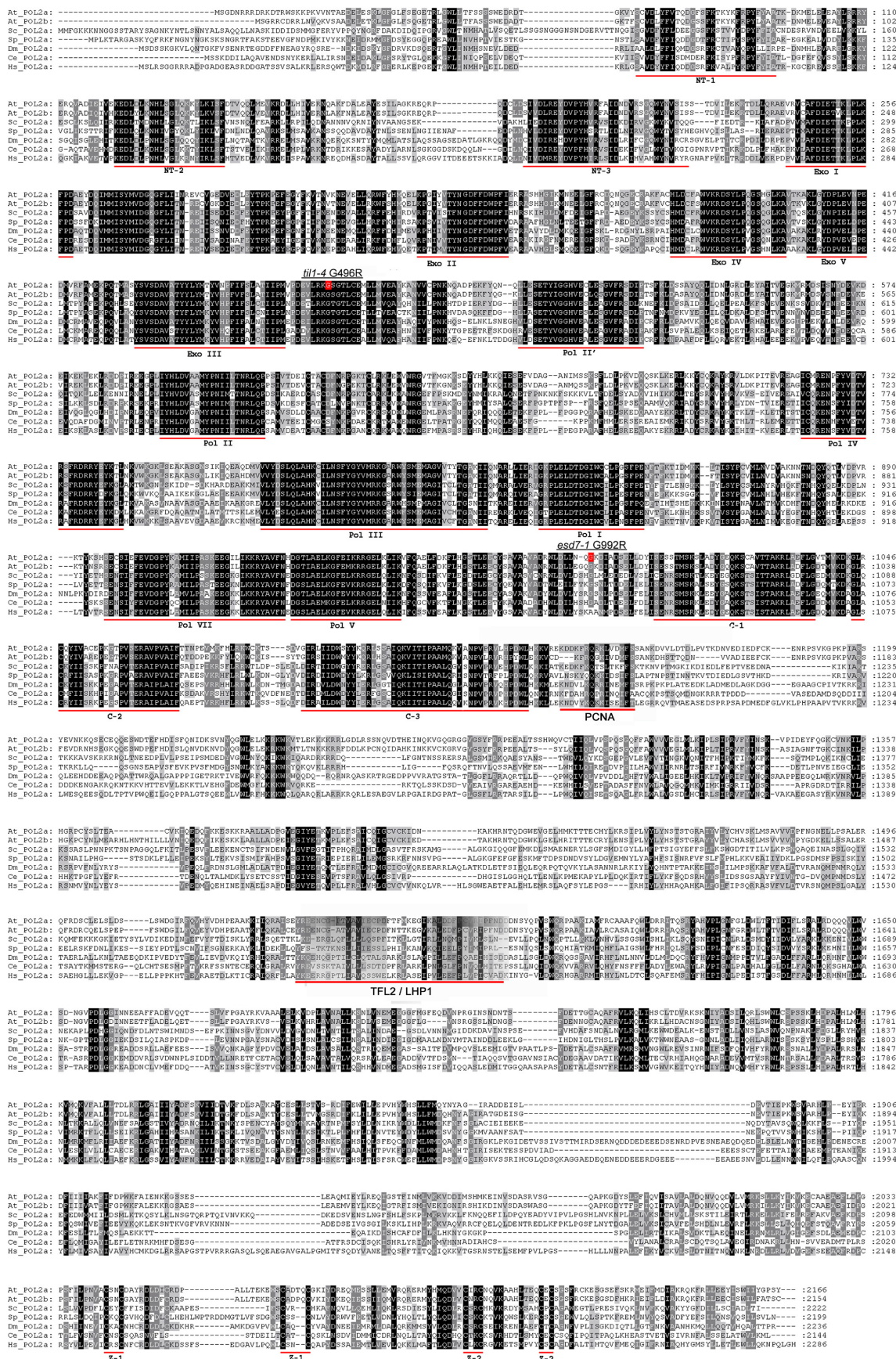


Figura 9. Comparación de la secuencia de AtPOL2a (locus At1g08260) con el homólogo AtPOL2b (locus At2g27120) y con los ortólogos de otros organismos eucariotas. Se indican en rojo los dominios NT (N-terminal), Exo (exonucleasa), Pol (polimerasa), C (central), Z (dedo de zinc) y las mutaciones puntuales *tli1-4* y *esd7-1*. En gris se resaltan los posibles dominios de interacción de ESD7 con las proteínas PCNA y TFL2/LHP1.

Como puede observarse en la figura 11, en condiciones de DL el alelo *esd7-1* introgresado en fondo genético Columbia desarrolla alrededor de 10 hojas en comparación con las 12 de la planta silvestre, mientras que en condiciones de DC desarrolla alrededor de 30 hojas en contraste con las 60 hojas de la planta silvestre. Por lo tanto, el fenotipo de floración temprano de *esd7-1* se conserva en fondo genético Col, siendo en condiciones no inductivas de floración donde se observa una diferencia más significativa entre el mutante *esd7-1* y la planta silvestre.

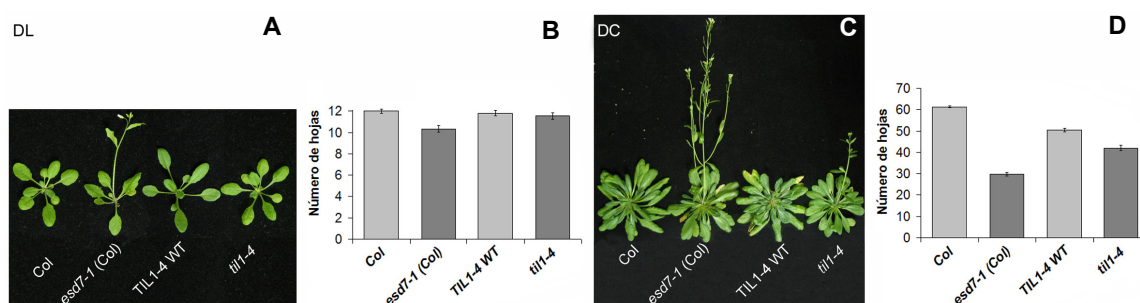


Figura 11. Fenotipo de floración de los mutantes *esd7-1* introgresado en fondo Col y *til1-4*, analizados en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres y mutantes *esd-1* y *til1-4*, en DL y DC respectivamente; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres y mutantes *esd-1* y *til1-4* en DL y DC respectivamente.

Por otro lado y como ya se ha comentado, recientemente ha sido caracterizado a nivel molecular el mutante *til1-4*, alélico de *esd7-1* (Jenik et al. 2005). Dado que los autores de este trabajo no caracterizaron en detalle el fenotipo de floración para el mutante *til1-4*, decidimos analizar el tiempo de floración de este alelo comparándolo con su parental de origen (Wassilewskija / Landsberg *erecta*), con el objeto de profundizar más acerca del efecto tanto de los diferentes alelos de *AtPOL2a*, como de los fondos genéticos en los que se encuentran, sobre el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Así hemos podido determinar que el alelo *til1-4* presenta un fenotipo de floración ligeramente más temprano en condiciones de DL con respecto a su fondo genético parental (figura 11), concluyéndose que en estas condiciones de fotoperiodo existe una diferencia estadísticamente significativa entre el fenotipo de floración del mutante *til1-4* y la planta silvestre, aunque ésta es muy pequeña y no fue valorada debidamente hasta aumentar la población del análisis. Sin embargo, en condiciones de DC el fenotipo de floración del mutante *til1-4* es claramente más temprano que el de la planta silvestre, de forma similar a lo observado en el alelo *esd7-1*.

26. Análisis del tiempo de floración de dobles mutantes *Atpol2a Atpol2b*.

Con el fin de estudiar el posible papel redundante del gen homólogo *At2g27120* de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ (*AtPOL2b*) con *ESD7/AtPOL2a* en el control del tiempo de floración, dado que los análisis genéticos publicados sugerían la existencia de una función parcialmente redundante entre ambos homólogos durante el desarrollo embrionario (Jenik et al. 2005), nos propusimos realizar un análisis detallado del tiempo de floración del alelo mutante aislado *Atpol2b*, así como del doble mutante *esd7-1 Atpol2b*. Como se puede observar en la figura 12, el mutante *Atpol2b* no presenta un tiempo de floración distinto al de la

planta silvestre (Col) en cualquiera de las condiciones de fotoperiodo estudiadas. Por su parte, en condiciones de DL el doble mutante *esd7-1 Atpol2b* tampoco muestra una diferencia significativa con respecto al mutante *esd7-1*, en cuanto al número de hojas formadas antes de la apertura de la primera flor, si bien parece elongar el tallo floral más rápidamente que el mutante *esd7-1*. Sin embargo, en condiciones de DC, el doble mutante *esd7-1 Atpol2b* desarrolla alrededor de 26 hojas en comparación con las 30 hojas que desarrolla el mutante *esd7-1*, lo cual sugiere una redundancia funcional de ambos loci en el control del tiempo de floración, como ya se había sugerido para otros caracteres del desarrollo (Jenik et al. 2005).

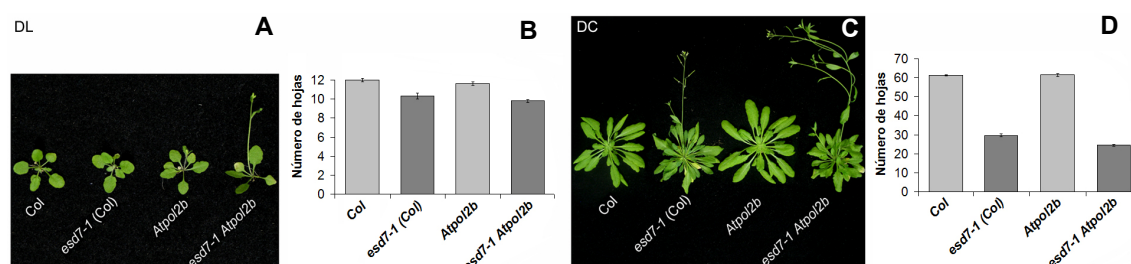


Figura 12. Fenotipo de floración del mutante *Atpol2b* y del doble mutante *esd7-1 Atpol2b*, analizados en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes en DL y DC respectivamente; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes en DL y DC respectivamente.

27. Análisis del efecto de la mutación *esd7* en otros caracteres del desarrollo vegetativo y reproductivo.

27.1. La mutación *esd7* afecta principalmente a la fase adulta del desarrollo vegetativo.

Arabidopsis posee una fase juvenil en su desarrollo vegetativo, en la que las hojas son pequeñas, redondeadas y los tricomas se sitúan en el haz (figura 1). En la fase adulta, las hojas son más grandes, ovaladas y desarrollan tricomas en ambas caras de la hoja (Telfer et al., 1997). Con el fin de determinar que fases del desarrollo vegetativo están alteradas en el mutante *esd7-1* analizamos su comportamiento a lo largo de las mismas. Como se muestra en la figura 13, el mutante *esd7-1* está afectado fundamentalmente en la duración de la fase vegetativa adulta, observándose principalmente una disminución en el número de hojas adultas de la roseta. Así, mientras que en condiciones de DL la planta silvestre desarrolla en torno a 3 hojas adultas, el mutante *esd7-1* rara vez desarrolla una hoja que tenga tricomas a ambos lados de la hoja. En condiciones de DC estas diferencias se incrementan y mientras que la planta silvestre desarrolla aproximadamente 18 hojas adultas, el mutante *esd7-1* solo desarrolla 4 hojas. Por lo tanto, se puede concluir que tanto en condiciones de DL como de DC, la fase adulta en *esd7-1* está drásticamente reducida.

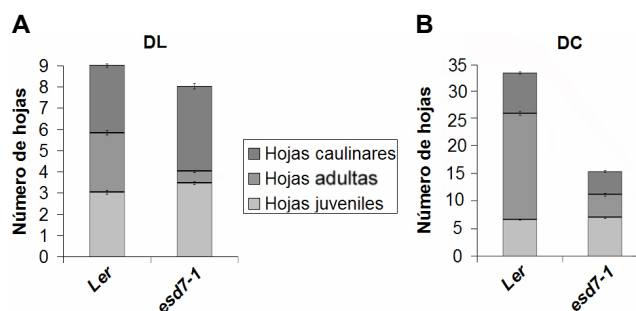


Figura 13. Cuantificación de la duración de las fases del desarrollo vegetativo del mutante *esd7-1*. A: en condiciones de DL; B: en condiciones de DC.

27.2. La mutación *esd7* afecta a la morfología foliar.

Tal y como se ha descrito para otros mutantes afectados en las transiciones de fase del desarrollo vegetativo (Telfer y Poethig 1998; Clarke et al, 1999; Berardini et al, 2001; Bollman et al. 2003; Hunter et al. 2003), la morfología de hoja del mutante *esd7-1* también se encuentra alterada. Como se muestra en la figura 14, el mutante *esd7-1* posee hojas de forma lanceolada y de un tamaño más pequeño que las de la planta silvestre. Por otro lado, las observaciones realizadas en el mutante *til1-4* revelan que el fenotipo de hoja es muy similar al observado en el mutante *esd7-1* (Jenik et al., 2005).



Figura 14. El mutante *esd7-1* presenta hojas lanceoladas y de menor tamaño que la planta silvestre.

El cambio en el tamaño de los órganos puede reflejar una alteración en el tamaño y/o en el número de células presentes en los mismos (Mizukami et al. 2000). Con el fin de investigar si el menor tamaño de las hojas de *esd7-1* era causado por defectos en división celular o en procesos de expansión celular, se examinaron tanto el tamaño de las hojas como el número de células en las hojas del mutante y se compararon con los resultados obtenidos en las plantas silvestres. Para ello se realizaron análisis microscópicos y se cuantificaron las células epidérmicas de la primera y tercera hoja de la roseta, siguiendo protocolos descritos (Fu et al 2002; Tsukaya, 2002; Li et al, 2003; Mathur et al, 2003). De esta forma hemos podido determinar que el mutante *esd7-1* posee un número menor de células epidérmicas por unidad de superficie que la planta silvestre, tanto para la primera como para la tercera hoja de la roseta, por lo que el menor tamaño de las hojas del mutante se podría asociar con una disminución en el número de células, pero no del tamaño de las mismas. De hecho, los análisis de microscopía realizados indicaron que las células epidérmicas del mutante *esd7-1* eran de un tamaño mayor que las de la planta silvestre (figura 15 C) y los cortes histológicos realizados en la 1ª hoja de la roseta mostraron que el parénquima contenía espacios intercelulares mayores

que los observados en las hojas de la planta silvestre (figura 15 A). Además, la cuantificación de la superficie media de las células epidérmicas de las hojas del mutante indicó que son de mayor tamaño que las de la planta silvestre (figura 15 C) y por lo tanto, el menor tamaño de hoja observado en el mutante *esd7-1* podría ser una consecuencia directa de tener un menor número de células, con un tamaño mayor que las de la planta silvestre. Mediante un análisis SEM hemos confirmado que las células epidérmicas de las hojas del mutante *esd7-1* son de un tamaño mayor y que este además, posee un menor número de células epidérmicas en sus hojas (figura 15 B y C). Por consiguiente, la mutación *esd7-1* podría reducir la división celular pero no la expansión celular durante el desarrollo de la hoja

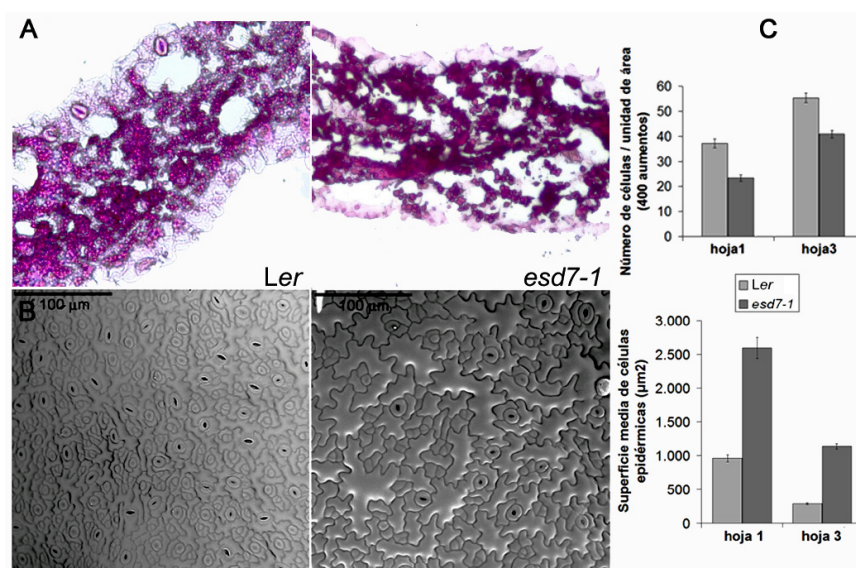


Figura 15. Tamaño de las células epidérmicas de las hojas del mutante *esd7-1* y comparación con las de la planta silvestre A: Corte transversal de las hojas; B: SEM de las células epidérmicas de las hojas; C: comparación del número de células por unidad de área de la primera hoja de la roseta de *esd7-1* con respecto a la planta silvestre; D: comparación del tamaño medio celular (μm^2) de las hojas de *esd7-1* de la primera hoja de la roseta con respecto a la planta silvestre.

27.3. La mutación *esd7* afecta al tamaño y morfología de las flores y los frutos.

Caracteres reproductivos tales como el tamaño y la forma de las flores y de los frutos, también están alterados en el mutante *esd7-1* (figura 16), si bien su aparición es dependiente del fondo genético en el que se encuentre la mutación. Así, hemos podido observar que las flores de *esd7-1* en fondo genético Ler, presentan un menor tamaño que las de la planta silvestre y sus órganos habitualmente presentan una forma alargada, sin que existan evidencias de cambios homeóticos en la distribución de los mismos (figura 16 A). Por otro lado, los frutos del mutante *esd7-1* presentan un menor tamaño que los de la planta silvestre, si bien en el mutante introgresado en fondo genético Col, esta diferencia es mucho menor (figura 16 A y B). Asimismo, hemos observado que las semillas del mutante *esd7-1* son fértiles mientras que las del mutante *til1-4* presentan un grado de infertilidad elevado, algo que concuerda además con el tamaño reducido de sus silicuas.

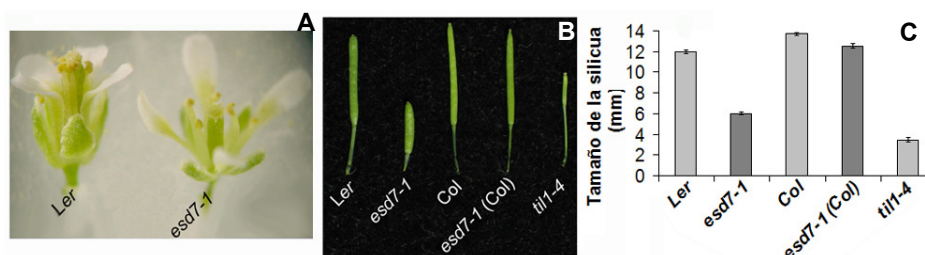


Figura 16. Morfología y tamaño de flores y frutos del mutante *esd7-1* y comparación con las de la planta silvestre. A: Morfología de las flores mutantes y comparación con las silvestres; B y C: Fenotipos observados y cuantificación del tamaño para frutos de los mutantes *esd7-1*, *til1-4* y de las correspondientes plantas silvestres.

27.4. La mutación *esd7* afecta al desarrollo de la raíz principal.

El mutante *esd7-1* muestra alteraciones en otros aspectos del desarrollo que no se limitan a la parte aérea de la planta, sino que también afectan al desarrollo de la raíz. Hemos comprobado que la raíz principal ve comprometido su desarrollo de una forma dramática, produciéndose de forma paralela un considerable aumento del número de raíces adventicias. Como puede observarse en la figura 17, la raíz principal del mutante no aumenta apenas de tamaño durante los primeros 15 días de desarrollo, alcanzando un tamaño máximo de 7 mm, frente a los 50 mm que puede alcanzar la raíz de la planta silvestre. Además, cuando más se desarrolla la raíz principal del mutante es durante los primeros días tras la germinación, alcanzando 5 mm de tamaño en el quinto día, frente a los 17 mm que desarrolla la raíz de la planta silvestre. A partir de ese momento en el mutante *esd7-1* empiezan a desarrollarse raíces adventicias, algo que no ocurre en la planta silvestre más que a partir del día 10 después de la germinación.

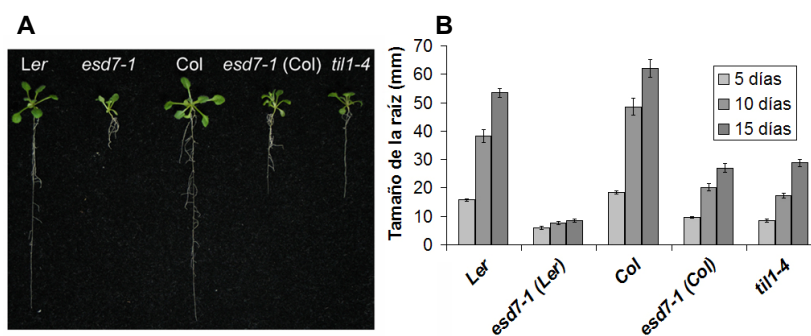


Figura 17. A: Fenotipo observado en raíces principales de plantas de 15 días de edad de *Ler*, *esd7-1*, *Col*, *esd7-1* (*Col*) y *til1-4* y B: cuantificación del desarrollo de sus raíces principales.

Para el mutante *til1-4* se ha descrito un desarrollo radicular embrionario característico (Jenik et al. 2005). Los autores de este trabajo postulan que en *til1-4* se produce una distribución asimétrica de auxinas en el centro quiescente durante el desarrollo embrionario y que ciertos genes tales como *SCARECROW* (*SCR*) presentan una expresión asimétrica, probablemente debido a un patrón anormal de división de las células embrionarias de la hipófisis, que darán lugar a la raíz principal (Jenik et al., 2005). Nosotros hemos podido comprobar que *til1-4* presenta un desarrollo radicular semejante al encontrado para el mutante

esd7-1 introgresado en fondo genético Col (figura 17). Con el fin de determinar el estado del centro quiescente del meristemo radicular de *esd7-1*, hemos realizado un análisis de microscopía confocal de la raíz en plántulas de 7 días, utilizando una tinción diferencial con yoduro de propidio que permite visualizar la pared celular y poder así observar la morfología que presentan las células (figura 18). Estos estudios microscópicos han revelado que la raíz principal del mutante *esd7-1* posee un centro quiescente totalmente desorganizado y que la asimetría celular es aún mayor que la que presenta el alelo mutante *til1-4*, en el que el centro quiescente solamente está algo desplazado y existe una relativa asimetría celular con respecto a la planta silvestre, probablemente también debida a una pérdida del patrón normal de división celular durante la fase post-embionaria (figura 18).

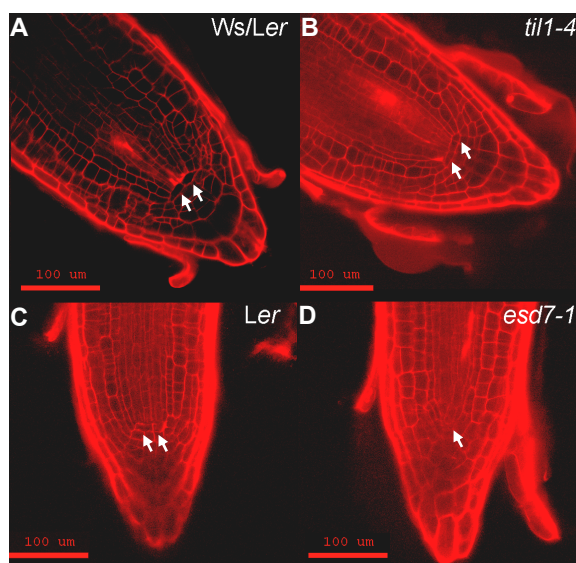


Figura 18. Microscopía confocal de la raíz de plántulas de 7 días del mutante *esd7-1* y del alelo *til1-4* (B y D), con respecto a sus parentales silvestres (A y C) respectivos. Se indica la posición de células del centro quiescente de cada uno de los mutantes, comparándolo con su parental de origen.

Por otro lado, hemos realizado un análisis de la expresión del gen *SCR* en plántulas mutantes *esd7-1* de 7 días en fondo Col, utilizando para ello una fusión de 2,5 kpb del promotor de dicho gen dirigiendo la expresión del gen delator que codifica la proteína verde fluorescente (*SCR::GFP*; Wysocka-Diller et al., 2000) y visualizando dicha expresión mediante microscopía confocal por superposición de imágenes de emisión de GFP, frente a tinción diferencial con yoduro de propidio. Empleando esta fusión se ha observado la expresión del gen delator en células quiescentes (QC) y al principio de la división cortex/endodermis (Co/En), siendo la expresión continua en la endodermis y discontinua en el cortex de plantas de tipo silvestre (Helariutta et al., 2000). En el mutante *esd7-1*, los datos obtenidos indican la existencia de una mayor expresión de *GFP* en ciertas agrupaciones de células y una expresión discontinua en las células que rodean al centro quiescente del meristemo radicular (figura 19). Estos datos contrastan además, con las observaciones realizadas a nivel de la hipófisis en el mutante *til1-4*, donde durante el desarrollo embrionario la expresión del delator *GFP* se localiza en células que normalmente no lo expresan o se expresa de forma asimétrica (Jenik et al., 2005).

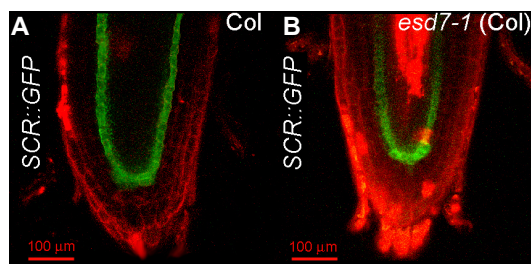


Figura 19. Análisis de la expresión del promotor del gen *SCR* fusionado a *GFP* en el mutante *esd7-1*. Imagen de microscopía confocal de la raíz principal mostrando la expresión de *SCR::GFP* en plántulas de Col (A) o en *esd7-1*(B).

28. La mutación *esd7-1* afecta al nivel de expresión del gen de identidad de meristemo *STM*.

Con el objeto de precisar si al igual que el meristemo radicular, también el meristemo apical está afectado en el mutante *esd7-1*, realizamos un análisis de expresión para dos de los genes de identidad de meristemo implicados en procesos independientes de mantenimiento del mismo, tales como *CLV3* y *STM*, utilizando para ello plantas transgénicas en fondo mutante *esd7-1* con construcciones portadoras de las secuencias promotoras de dichos genes dirigiendo la expresión del gen delator *uidA*.

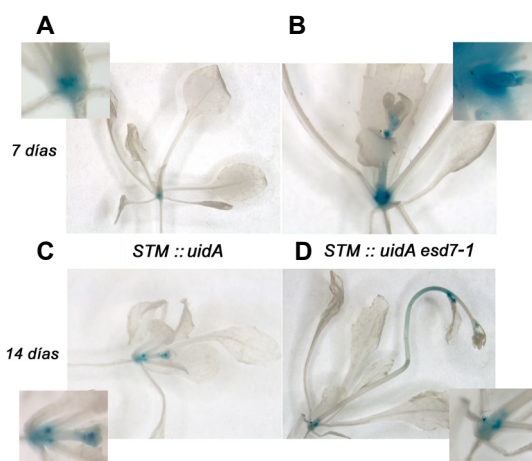


Figura 20. Análisis de la expresión del promotor de *STM* fusionado a *uidA*; A y C: en plántulas silvestres (Col) de 7 y 14 días de edad respectivamente; B y D: en plántulas mutantes *esd7-1* de 7 y 14 días de edad respectivamente.

Como puede observarse en la figura 20, el nivel de expresión de *STM::uidA* es mayor en el meristemo apical del mutante *esd7-1* que en el meristemo de plantas silvestres, presentando un máximo de expresión a los 7 días; dicho aumento de expresión se mantiene a lo largo del tiempo, siendo algo más elevada en el mutante *esd7-1* a los 14 días, si bien la diferencia no es tan acusada como la observada a los 7 días. Sin embargo, el nivel de expresión de *CLV3::uidA* no varía significativamente en el mutante *esd7-1* (datos no mostrados). Por lo tanto, la mutación *esd7-1* afectaría a la regulación de la expresión del gen de identidad de meristemo *STM*, pudiendo requerirse *ESD7* para reprimir su expresión a nivel del meristemo apical, mientras que no participaría en la regulación de *CLV3*.

29. Análisis de la expresión del gen *ESD7*.

29.1. La mutación *esd7* no afecta a los niveles de expresión del mensajero de *ESD7*.

Con el objeto de determinar si la mutación *esd7* afecta a los niveles de expresión de su propio mensajero, realizamos una cinética de expresión de *ESD7* a lo largo del día tanto en condiciones de DL como de DC. Dado que los datos encontrados en las bases de datos de ESTs indicaban que los niveles de expresión de este gen eran muy bajos, empleamos técnicas de RT-PCR para realizar este estudio (figura 21). De esta forma, hemos observado que el mutante posee unos niveles de expresión de *ESD7* similares a los de la planta silvestre en las dos condiciones de fotoperiodo analizadas; además, hemos comprobado que la mutación *esd7-1* no provoca ningún cambio significativo en el patrón de expresión de *ESD7*, observándose un pico de expresión a la mitad del día, similar al observado en plantas silvestres.

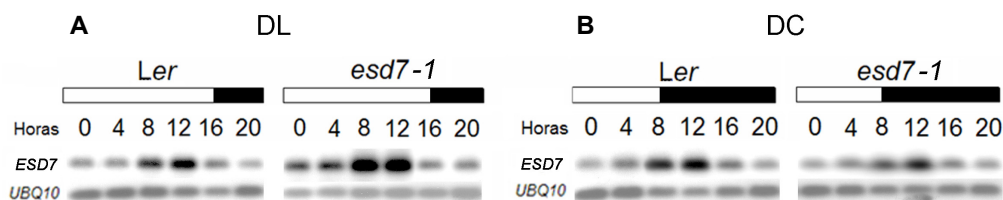


Figura 21. Análisis del patrón de expresión del mensajero de *ESD7* durante un ciclo diario en plántulas del ecotipo Ler y en el mutante *esd7-1*; A: plántulas de 7 días de edad en condiciones de DL; B: plántulas de 14 días de edad en condiciones DC. Las barras en blanco y negro representan la duración del día y la noche respectivamente.

Por lo tanto, podemos concluir que el mutante *esd7-1* podría tratarse de un alelo hipomórfico en el que probablemente la función de la proteína esté alterada o presente una menor actividad que la codificada por el alelo silvestre, revelando de esta forma una nueva funcionalidad para la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ en el control de la transición floral y en otros procesos de desarrollo.

29.2. *ESD7* se expresa de forma preferencial en tejidos con una alta tasa de división.

Para determinar el patrón de expresión tisular de *ESD7* se realizó tanto un análisis de expresión de diferentes tejidos a través de aproximaciones de RT-PCR (figura 22), como un experimento de transformación genética de plantas Col con una construcción portadora del gen delator *uidA* dirigido por una región promotora de 1,1 Kpb del gen *ESD7* (*pESD7::uidA*; figura 23).

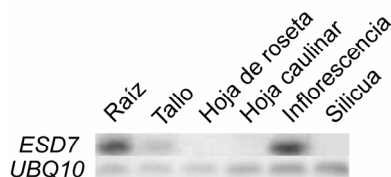


Figura 22. Análisis del patrón de expresión tisular de *ESD7* en plantas de 3 semanas de edad del ecotipo Col.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el patrón de expresión tisular de *ESD7* es ubicuo en la mayoría de los tejidos analizados y que particularmente se observa una mayor expresión del gen delator *uidA* en los tejidos donde existe una mayor tasa de división celular, como son los meristemos apical y radicular (figura 23 A), en el tejido vascular, en los carpelos y en las silicuas en formación, como cabe esperarse para un gen implicado en procesos de replicación del DNA (figura 23 A y B).

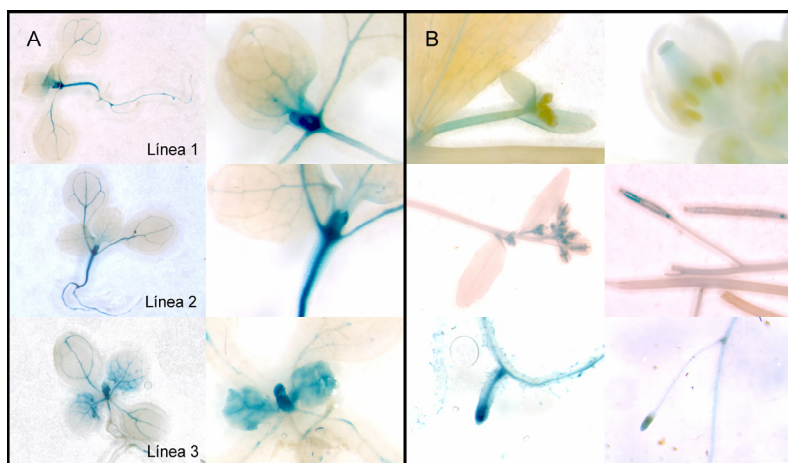


Figura 23. Análisis del patrón de expresión del promotor de *ESD7* fusionado a *uidA*. A: Plántulas de 10 días de líneas transgénicas independientes generadas en fondo Col, portadoras de la construcción *pESD7::uidA*. B: Detalle de la expresión de *uidA* en diferentes órganos como raíz, flor o silicua de plantas transgénicas de 3 semanas portadoras de la misma construcción.

Por otro lado, el gen *AtDPB2*, que codifica la subunidad reguladora del complejo de la DNA polimerasa ϵ , muestra un patrón de expresión tisular muy similar al observado para *ESD7* (Ronceret et al. 2005). Los datos publicados en torno a la expresión espacio-temporal de *AtDPB2*, basados en experimentos de transformación genética similares a los que hemos realizado para *ESD7*, revelan que la expresión del gen delator *uidA* se limita a los meristemos apical y radicular (Ronceret et al. 2005). Por lo tanto, la correspondencia de expresión de ambos promotores en la mayoría de tejidos analizados soportaría la idea de que, al igual que en otros eucariotas, en *Arabidopsis* ambos genes codificarían para proteínas que se expresan en los mismos tejidos y que podrían tener funciones conjuntas.

30. Regulación de la expresión de *ESD7*.

30.1. Regulación de la expresión de *ESD7* por exposición de *Arabidopsis* a agentes genotóxicos.

El análisis de datos transcriptómicos reveló que *ESD7* se regulaba positivamente por la exposición de plántulas de *Arabidopsis* a radiación ionizante γ (Culligan et al., 2006) y a drogas que provocan estrés genotóxico (Chen et al., 2003; del Olmo et al., 2009). Aunque las respuestas a daños en el DNA aún están poco caracterizadas en plantas, se sabe que existen diversos mecanismos de reparación de DNA que actúan en paralelo y a menudo de una forma

redundante en la mayoría de los eucariotas (Tuteja et al., 2009). En concreto, la DNA polimerasa ϵ de levaduras ha sido implicada en los mecanismos de reparación por escisión de nucleótidos (NER), en mecanismos de reparación por escisión de bases (BER) y en mecanismos de reparación de roturas de doble cadena (DSR) por recombinación homóloga (HR) (Pursell y Kunkel, 2008). Una forma particularmente letal de daño que se produce en el DNA son las roturas de DNA de doble cadena (DSB) (Tuteja et al., 2009). Las células poseen dos vías de reparación de las DSBs, una a través de HR y otra por un mecanismo de recombinación no homóloga denominado “unión a secuencias terminales no homólogas” (NHEJ) (revisado por Puchta, 2005). La ruta de reparación NHEJ es un proceso en el que los extremos de una rotura de doble cadena (DSB) pueden ser modificados; sin embargo, la ruta de reparación por HR restablece de forma precisa la continuidad de la fractura de la molécula de DNA, utilizando como plantilla una de las hebras homólogas de DNA intacta (Tuteja et al., 2009). Agentes tales como las radiaciones X y γ , el metil-metanosulfonato (MMS) y la Bleomicina (BLE), provocan este tipo de roturas de doble cadena, mientras que otros como la radiación ultravioleta (UV) o la mitomicina C (MMC) provocan entrecruzamientos en el DNA (Friedberg et al. 2006).

Con el objeto de corroborar si la expresión de *ESD7* estaba regulada de manera positiva por drogas que generaban un estrés genotóxico (Chen et al., 2003), llevamos a cabo un análisis de la expresión de dicho gen mediante RT-PCR, usando como material de partida RNA de plántulas de 7 días tratadas con una combinación de las drogas MMC y BLE, más el respectivo control negativo sin tratamiento alguno (figura 24). Los resultados obtenidos permiten afirmar que la expresión de *ESD7* aumenta de manera dramática en respuesta al estrés genotóxico generado por ambas drogas (figura 24).

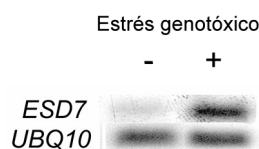


Figura 24. Análisis de la expresión de *ESD7* en respuesta a la exposición a drogas genotóxicas. (-) sin tratamiento, (+) con exposición a MMC y BLE.

31. El mutante *esd7-1* presenta mayor susceptibilidad a MMC.

Con el objeto de profundizar en el papel de la DNA polimerasa ϵ en la reparación del DNA, hemos analizado la susceptibilidad que muestra el mutante *esd7-1* a drogas tales como la MMC y la BLE, creciendo tanto plantas silvestres como *esd7-1* en diferentes medios de cultivo. Como se puede observar en la figura 25, el mutante *esd7-1* presenta mayor susceptibilidad a MMC que las plantas silvestres y dicha susceptibilidad se observa tanto en un medio líquido como en uno sólido. Para llevar a cabo su cuantificación, hemos utilizado el método de crecimiento en medio líquido con diluciones seriadas de la droga de ensayo MMC. Los resultados obtenidos indican que el mutante *esd7-1* es más sensible a MMC que la planta

silvestre, presentando síntomas de clorosis e inhibición del crecimiento a concentraciones entre 2-4 mg/l de MMC, y no desarrollándose a concentraciones superiores, lo cual contrasta con los 6-8 mg/l de MMC que son necesarios para que la planta silvestre empiece a manifestar los mismos síntomas de clorosis.

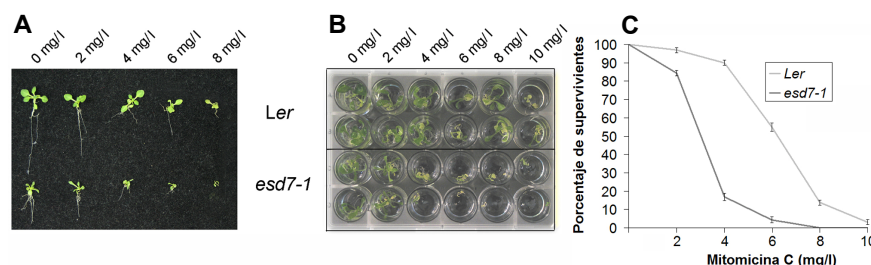


Figura 25. Análisis de susceptibilidad a drogas genotóxicas de plantas silvestres y del mutante *esd7-1*. A: Crecimiento en medio sólido con MMC; B: Crecimiento en medio líquido con MMC. C: Cuantificación de la susceptibilidad a MMC del mutante *esd7-1* en medio líquido y comparación con la de las plántulas silvestres.

Un ensayo similar utilizando BLE indica que el mutante *esd7-1* no presenta una mayor susceptibilidad que la planta silvestre a esta droga (datos no mostrados), lo que sugiere que el mutante sería más sensible al estrés genotóxico cuando aparecen entrecruzamientos en el DNA.

32. La mutación *esd7* afecta a los niveles de expresión de genes implicados en mecanismos de reparación del DNA.

Hemos analizado también la expresión de genes implicados en diferentes mecanismos de reparación del DNA tales como *KU70*, *KU80*, *RAD51*, *BRCA2*, y *GR1* en el mutante *esd7-1* y en plantas silvestres. Para ello, hemos determinado las cinéticas de expresión de estos genes a lo largo del día y en diferentes condiciones de fotoperiodo (figura 26). Los análisis de RT-PCR llevados a cabo para genes implicados en mecanismos de reparación por recombinación homóloga, tales como *RAD51*, *BRCA2* y *GR1*, indican la existencia de un aumento significativo en los niveles de expresión de *RAD51* en el mutante *esd7-1*, en cualquier condición de fotoperiodo, y de cambios sutiles en el patrón de expresión de *BRCA2* y *GR1* principalmente en condiciones de DL. Por otro lado, los niveles de expresión de genes implicados en mecanismos de reparación de DSB por NHEJ tales como *AtKU70* y *AtKU80*, no muestran una variación significativa de expresión en el mutante *esd7-1*. En este sentido, los datos procedentes de los microordenamientos de DNA por exposición a BLE (NASCARRAYS-67, West et al, 2004) o por exposición a radiación ionizante γ (Culligan et al., 2006), tampoco indican un aumento de los niveles de expresión de *AtKU70* y *AtKU80* en respuesta a dichos tratamientos en plántulas silvestres. Por el contrario, genes tales como *AtRAD51*, *AtBRCA1* y *ESD7* si que presentan un aumento significativo en sus niveles de expresión en respuesta al estrés generado por dichos agentes. Por lo tanto, la mutación *esd7* podría originar un defecto en la reparación del DNA asociado a la replicación y determinados genes implicados en mecanismos de reparación del DNA por RH tienen desregulada su expresión en el mutante *esd7*.

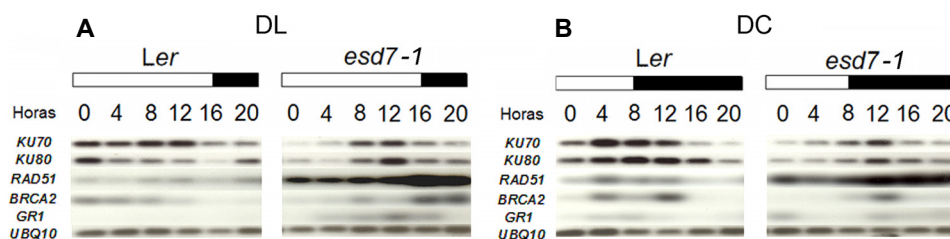


Figura 26. Análisis de la expresión de genes implicados en reparación del DNA durante un ciclo diario en plántulas de del ecotipo *Ler* y en el mutante *esd7-1*; A: plántulas de 7 días de edad en condiciones de DL; B: plántulas de 14 días de edad en condiciones DC. Las barras en blanco y negro representan la duración del día y la noche respectivamente en cada tratamiento.

33. La mutación *esd7* afecta a los niveles de expresión del gen *CYCB1;1*.

Tanto en levaduras como en mamíferos, las ciclinas mitóticas y las quinasas dependientes de ciclina son necesarias para la activación de los puntos de control del ciclo celular en respuesta a daños en el DNA y también para la reparación por RH (Rasmussen et al., 2000; Caspari et al., 2002; Grandin et al., 2003; Ira et al., 2004). Además, es en la transición G2/M del ciclo celular donde se garantiza la síntesis correcta y completa del DNA, antes de la entrada en mitosis y la citocinesis, y son las ciclinas de tipo B las que están involucradas en la transición G2/M en el caso de que existan daños en el DNA (Stark y Taylor, 2006).

Utilizando una planta transgénica portadora de una construcción donde el promotor de la ciclina *CYCB1;1*, que se expresa tras la entrada en la fase G2 del ciclo celular (Doerner et al., 1996), dirigiendo la expresión de una fusión de la β -glucuronidasa al dominio de destrucción de la ciclina *CYCB1;1* (Colon-Carmona et al., 1999), que marca células en fase G2 y en fase M temprana, hemos podido confirmar una fuerte activación de la expresión de dicha ciclina en la raíz del mutante *esd7-1* y un aumento de la estabilidad de la proteína en comparación con plantas silvestres (figura 27), lo cual sugiere que muchas de las células proliferantes del RAM del mutante *esd7-1* poseen un arresto del ciclo celular en fase G2/M, al igual que ocurre en los mutantes del complejo CAF-1 (Schönrock et al, 2006).

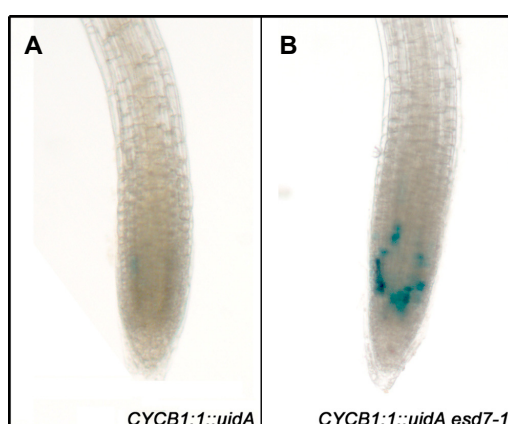


Figura 27. Análisis de la expresión del promotor de *CYCB1;1* fusionado a *uidA* y de la estabilidad de la proteína *CYCB1;1*. A: Expresión de *CYCB1;1::uidA* en la raíz de plántulas *Col*; B: expresión de *CYCB1;1::uidA* en la raíz de plántulas mutantes *esd7-1*.

34. Estructura del complejo de la DNA polimerasa ϵ de *Arabidopsis*. Estructura secundaria y terciaria de la subunidad catalítica AtPOL2a.

34.1. La subunidad catalítica POL2a y la subunidad reguladora DPB2 de la DNA polimerasa ϵ interaccionan “*in vivo*” en el núcleo.

En base a los resultados obtenidos previamente en *Saccharomyces* (Dua et al., 1998), Ronceret y colaboradores describieron una interacción física entre el extremo C-terminal de la subunidad catalítica AtPOL2a y la subunidad reguladora AtDPB2 de la DNA polimerasa ϵ de *Arabidopsis* mediante ensayos de doble híbrido en levaduras (Ronceret et al., 2005). Con el objeto de corroborar si la interacción entre la subunidad catalítica AtPOL2a y la reguladora AtDPB2 de la DNA polimerasa ϵ también ocurre “*in vivo*”, nos hemos planteado analizar dicha interacción a través de un sistema de complementación bimolecular de fluorescencia (Bracha-Drori et al., 2004). Este tipo de análisis tiene la ventaja de poder visualizar la interacción entre proteínas directamente en la célula vegetal, lo que hace que el análisis sea un reflejo de su comportamiento en la planta.

Para llevar a cabo este análisis utilizamos dos vectores compatibles (*pSPYNE* y *pSPYCE*) tipo *pBIFC* (Bimolecular fluorescence complementation) que permiten sobre-expresar proteínas de fusión, formadas por las proteínas completas o parte de ellas, fusionadas a los extremos N-terminal o C-terminal compatibles de la YFP, de tal forma que si la interacción entre las proteínas de interés tiene lugar, la cercanía entre los dominios YFP de cada proteína de fusión es suficiente para emitir luz fluorescente, una vez excitada la preparación de microscopia a la longitud de onda correspondiente (Bracha-Drori et al., 2004)

Las construcciones portadoras de los dominios de la YFP fusionadas a las proteínas de estudio fueron *pSPYNE-CtPOL2a* (dominio C-terminal de AtPOL2a fusionado al dominio N-terminal de YFP) y *pSPYCE-DPB2* (AtDPB2 fusionada al dominio C-terminal de YFP); se muestran los resultados obtenidos con las fusiones N-terminales, donde las proteínas de fusión contienen los dominios de la YFP en el extremo N-terminal. Estas construcciones junto con los controles pertinentes, fueron infiltradas en hojas de *Nicotiana bentamiana*, a través de cultivos de *Agrobacterium* portadores de las construcciones preparadas y transcurridos 8 días después de la infiltración, procedimos a realizar las preparaciones de microscopía. Con el propósito de identificar los núcleos de las células, las muestras fueron previamente tratadas con la tinción DAPI, ya que al tratarse de proteínas nucleares esperábamos que la interacción tuviera lugar en el núcleo. Además, se utilizaron tanto el filtro de YFP como el de DAPI, para así poder confrontar las microscopías y descartar falsos positivos de emisión fluorescente debido a la tinción DAPI u otros artefactos. En la figura 28 se puede observar que los controles negativos mostrados en A y B no tienen una emisión de fluorescencia relevante y que la emisión de fluorescencia DAPI es semejante a la obtenida en los dos primeros controles negativos, no

apreciándose núcleos fluorescentes o falsos positivos debidos a la tinción DAPI. Por otro lado, las combinaciones de interacción mostradas en D y F, presentan una mayor emisión de fluorescencia y en concreto, alguno de los núcleos analizados, muestra una clara emisión de fluorescencia. Estos resultados sugieren que la subunidad AtPOL2a interacciona “*in vivo*” con AtDPB2 en el núcleo.

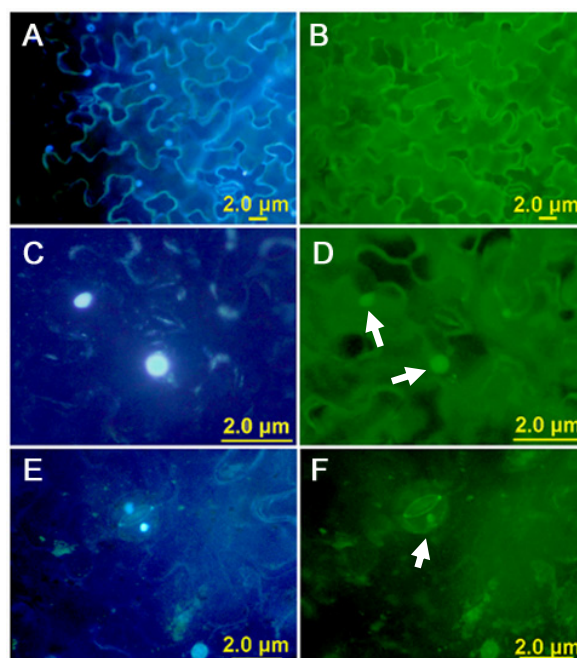


Figura 28. Análisis por BiFC de la interacción entre AtPOL2a y AtDPB2. A: Control negativo (*pSPYNE-CtPOL2a* + *pSPYCE* + *pBIN::p19* ó *pSPYCE-DPB2* + *pSPYNE* + *pBIN::p19*) con tinción DAPI (C) frente a filtro YFP (D); C, D, E y F: Controles de la interacción (*pSPYNE-CtPOL2a* + *pSPYCE-DPB2* + *pBIN::p19*). Las barras amarillas indican un tamaño aproximado de 2 μ m y las flechas la interacción detectada en el núcleo.

34.2. Modelado de la estructura secundaria y terciaria de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ .

Entre todos los enfoques teóricos actuales, el modelado comparativo es el único método fiable que puede generar un modelo tridimensional (3D) de una proteína a través de su secuencia de aminoácidos. La construcción de este modelo requiere de al menos una estructura tridimensional resuelta experimentalmente a través de técnicas cristalográficas de difracción de rayos X o bien de resonancia magnética nuclear (RMN) y disponer de una secuencia importante de aminoácidos similares a la secuencia diana (Schwede et al., 2003). Con el objeto de estudiar si la mutación *esd7* podría provocar un cambio de estructura en la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ , hemos utilizado las bases de datos y herramientas desarrolladas por SWISS-PROT y TrEMBL para obtener un modelo teórico de la estructura secundaria (figura 29) y terciaria (figura 30) de las proteínas AtPOL2a silvestre y mutada. Si bien la DNA polimerasa ϵ ha sido enmarcada dentro de las DNA polimerasas tipo B de eucariotas (Araki et al., 1992; Braithwaite et al. 1993; Edgell et al., 1997) y ambas estructuras están basadas en esta familia de polimerasas, el dominio C-terminal de la DNA

polimerasa ϵ posee una estructura desconocida (dominio DUF1744), por lo que el modelado de ambas proteínas sólo corresponde a la parte N-terminal de las mismas en comparación al dominio N-terminal de las polimerasas de la misma familia, tales como la DNA polimerasa α y δ , que poseen secuencias de menor tamaño. La predicción de estructura secundaria de la proteína mutada ESD7-1 (figura 29) indica que la mutación *esd7* provoca un cambio conformacional que afecta fundamentalmente al dominio POL I, y en menor medida a los dominios III-V y VII de la DNA polimerasa ϵ (figura 9), apoyando la hipótesis de que la mutación afecte a la zona que contiene, además de la función polimerasa, parte de la función exonucleasa correctora de errores.

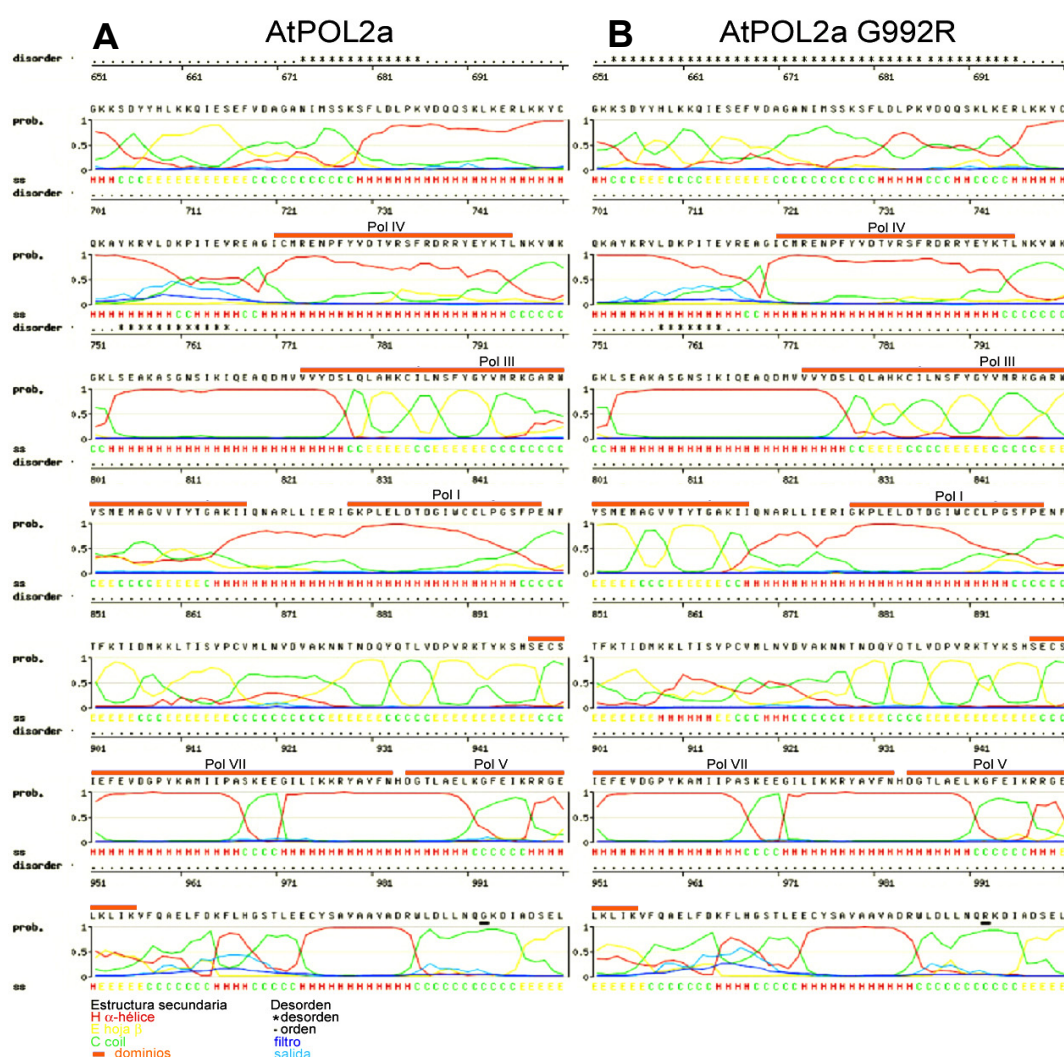


Figura 29. Modelación SWISS-PROT/TrEMBL de la estructura secundaria del extremo N-terminal de AtPOL2a y de la proteína mutada ESD7. Comparación de zonas de máxima discordancia entre A: AtPOL2a y B: AtPOL2a G992R (ESD7), en base a la estructura cristalográfica 1wns de POLBc (familia de DNA polimerasas tipo B).

Por otro lado, la predicción de la estructura terciaria muestra como la mutación *esd7* provocaría un cambio estructural de la proteína que afectaría la totalidad de su estructura terciaria (figura 30 B), en comparación con la estructura predicha para la proteína silvestre.

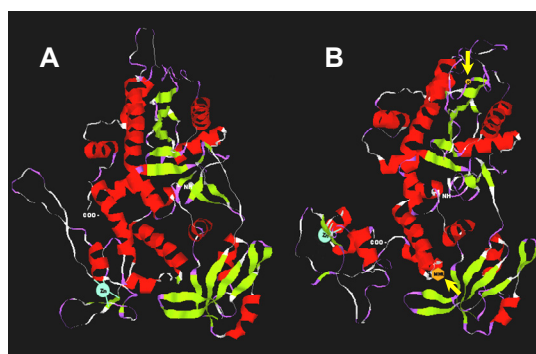


Figura 30. Modelación SWISS-PROT/TrEMBL de estructura terciaria del extremo N-terminal de la proteína silvestre ATPOL2a y de la proteína mutada ESD7 ATPOL2a. Comparación entre A: AtPOL2a y B: AtPOL2a G992R (ESD7) (B), en base a la estructura cristalográfica 1wns de POLBc (familia de DNA polimerasas tipo B).

35. Interacción del locus *ESD7* con genes de las rutas de promoción del tiempo de floración.

Clásicamente, el análisis fenotípico de dobles mutantes que presentan un fenotipo de floración tardío ha sido sistemáticamente utilizado para establecer las relaciones genéticas existentes entre los loci implicados en las rutas de promoción de la floración de *Arabidopsis* (Putterill et al., 1995; Koornneef et al., 1998a; Koornneef et al., 1998b; Simpson et al., 1999; Reeves y Coupland, 2001). Aunque los resultados de dichos análisis han permitido la formulación de un modelo hipotético para las rutas promotoras de la transición floral, queda aún por resolver como actúan muchos de los represores de la transición floral identificados y a qué nivel se integrarían en dicho modelo.

Como se ha comentado anteriormente, los alelos de inserción de T-DNA presentan un fenotipo de letalidad embrionaria y el hecho de que el mutante *esd7-1* sea un mutante de pérdida parcial de función, ha revelado su posible papel en el control del tiempo de la floración: por ello, con el objeto de integrar al locus *ESD7* en el modelo conceptual del control del tiempo de floración en *Arabidopsis*, hemos generando una serie exhaustiva de dobles y triples mutantes entre *esd7-1* y mutaciones representativas que afectan a genes implicados en las diferentes rutas promotoras de la floración.

35.1. Análisis de la posible interacción entre *ESD7* y genes de la ruta del fotoperiodo.

Hemos generado dobles mutantes de *esd7-1* con mutantes representativos de la ruta del fotoperiodo, como son *gi-3*, *fha-1* y *co-2*, y analizado las relaciones genéticas existentes entre ellos, tanto en condiciones de DL como de DC (figura 32). El tiempo de floración observado en cualquier condición de fotoperiodo para cada uno de los dobles mutantes analizados es intermedio (*esd7-1 fha-1*, *esd7-1 gi-3* y *esd7-1 co-2*), con respecto a las plantas mutantes parentales (*esd7-1*, *fha-1*, *gi-1* y *co-2*). Se podría concluir por tanto que *ESD7* no interaccionaría directamente con la ruta del fotoperiodo.

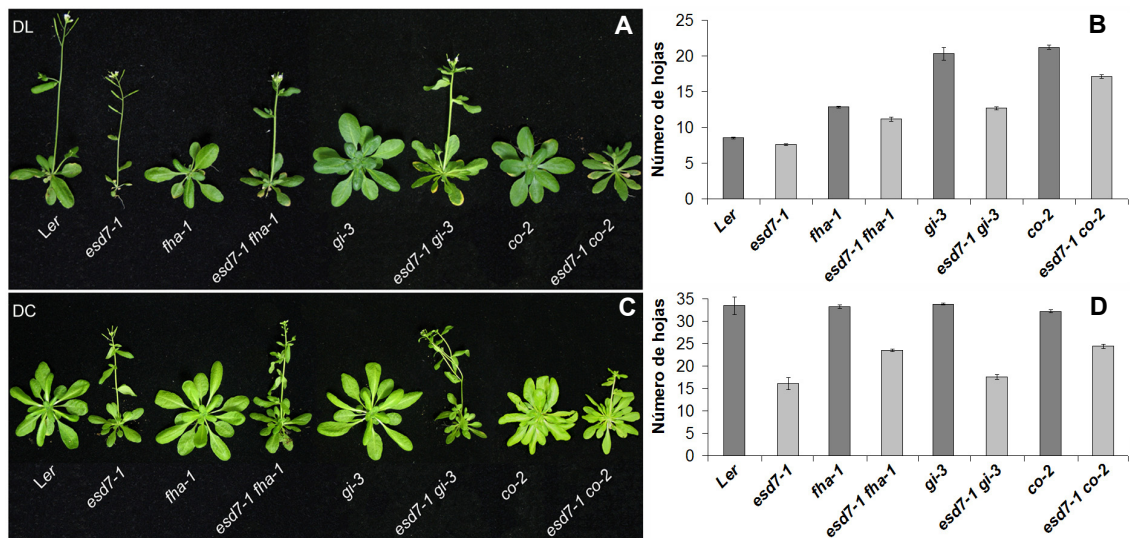


Figura 32. Fenotipo de floración de mutantes de la ruta de la ruta del fotoperiodo y de los dobles mutantes correspondientes con *esd7-1*, analizados en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes.

35.2. Análisis de la posible interacción entre *ESD7* y genes de la ruta autónoma.

También hemos generado los dobles mutantes entre *esd7-1* con diferentes mutantes representativos de la ruta autónoma como son *fve-1* y *fca-1* y hemos analizado su tiempo de floración tanto en condiciones de DL como en condiciones de DC (figura 33). Los datos obtenidos indican que *ESD7* no interacciona de una forma directa con la ruta autónoma de la floración, ya que como se puede observar el tiempo de floración de los dobles mutantes analizados es intermedio (*esd7-1 fca-1*, *esd7-1 fve-1*) con respecto a las plantas mutantes parentales (*esd7-1*, *fca-1* y *fve-1*).

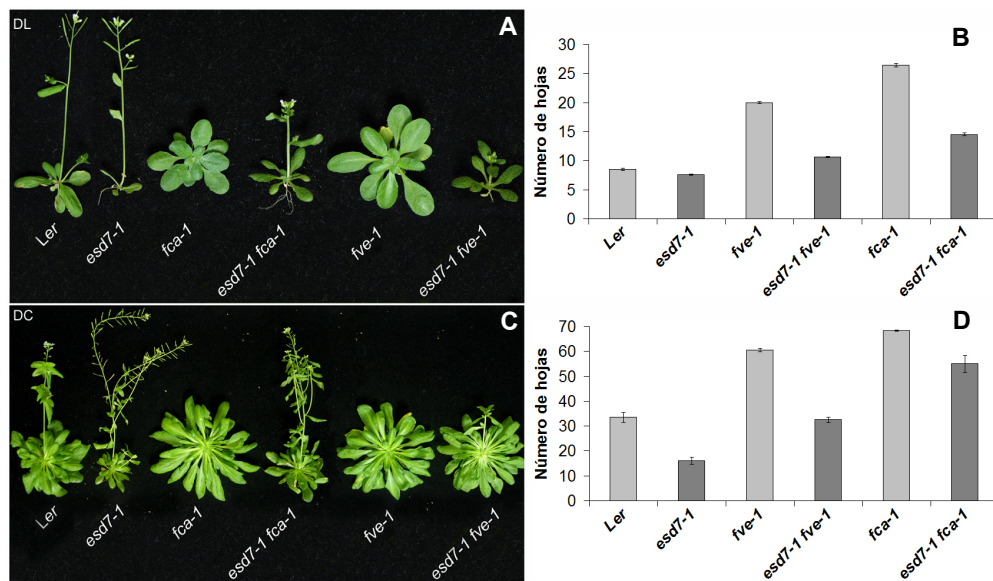


Figura 33. Fenotipo de floración de mutantes representativos de la ruta autónoma y de los dobles mutantes correspondientes con *esd7-1*, analizados en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes.

35.3. Análisis de la posible interacción entre *ESD7* y genes de la ruta de las GAs.

De igual manera hemos generado los dobles mutantes de *esd7* con mutaciones que afectan a la síntesis de GAs o a la transmisión de señales procedentes de las mismas. En la figura 34 se puede observar los fenotipos de los dobles mutantes *esd7-1 spy5* y *esd7-1 ga1-3* en condiciones de DL y DC. Los resultados obtenidos indican que el locus *ESD7* no interaccionaría con la ruta de transmisión de la señal de las GAs, ya que el doble mutante *esd7-1 spy5* presenta un tiempo de floración aditivo entre los dos parentales en cualquier condición de fotoperiodo. Por otra parte, el doble mutante *esd7-1 ga1-3* florece al mismo tiempo que el mutante *ga1-3* en condiciones DL y no florece si no se le añaden GAs de forma exógena en condiciones de DC.

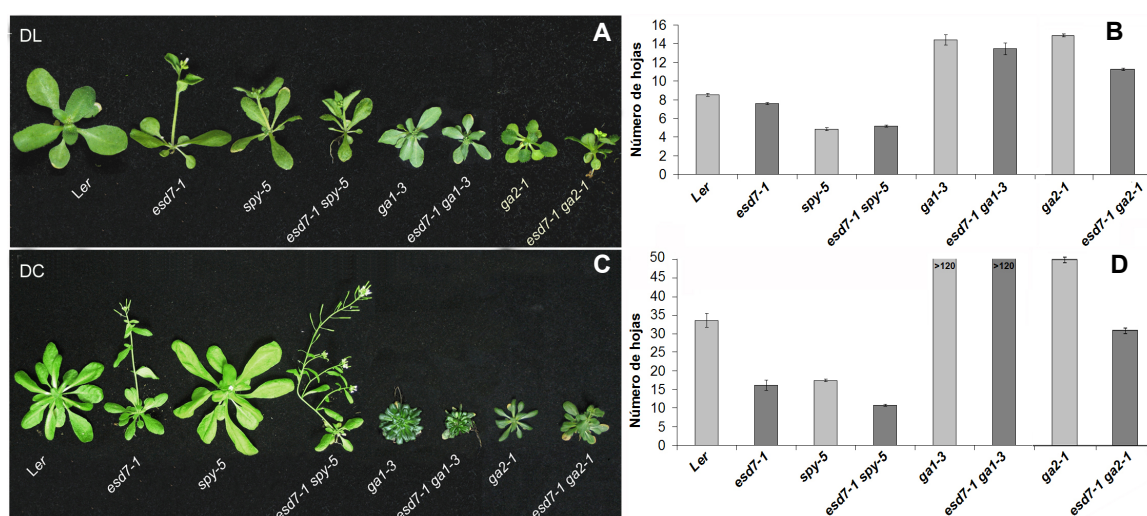


Figura 34. Fenotipo de floración de mutantes de la ruta de la GAs y de los dobles mutantes correspondientes con *esd7-1* analizados en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes.

Aún así, observamos que el doble mutante *esd7-1 ga1-3* presenta cierta variación de la floración en cualquier condición de fotoperiodo y en concreto en condiciones de DC, la administración de GAs provoca un alargamiento de los entrenudos y además se desarrollan órganos florales que ya están presentes en el doble mutante antes de la aplicación de la hormona (figura 35).



Figura 35. Detalle del fenotipo de floración del mutante *ga1-3* y del doble mutante *esd7ga1-3* en condiciones de DC. La flecha corresponde a la posición del botón floral, indicativo de que se ha producido la transición floral.

Estas observaciones sugieren que la ausencia total de GAs presente en el mutante *ga1-3* y en el doble mutante *esd7-1 ga1-3* podría enmascarar la relación genética existente entre ambos loci. Para resolver esta cuestión, generamos el doble mutante *esd7-1 ga2-1*, con el fin de comprobar su fenotipo en condiciones de DC, ya que el mutante *ga2-1* no tiene bloqueada la floración en estas condiciones de fotoperiodo. Como se puede observar en la figura 34, el tiempo de floración del doble mutante *esd7-1 ga2-1* es intermedio en cualquier condición de fotoperiodo, comparado con el tiempo de floración de los parentales, lo que nos permitiría concluir que *ESD7* no interacciona con la ruta de síntesis de GAs, si bien la mutación *esd7-1* muestra un fuerte requerimiento de GAs para florecer en condiciones fotoperiódicas de DC.

35.4. Análisis de la posible interacción entre *ESD7* y los integradores *FT* y *SOC1*.

El hecho de que los análisis genéticos llevados a cabo entre *esd7* y mutaciones representativas de las rutas promotoras de la floración no revelasen interacciones genéticas entre ellos, junto con el alto grado de pleiotropía mostrado por el mutante *esd7-1*, llevó a plantearnos que al igual que otros muchos loci represores de la transición floral, *ESD7* pudiera estar implicado en distintos procesos generales de la regulación génica que convergen en dianas claves de la transición floral (Pouteau et al. 2004). Para comprobar esta hipótesis, nos centramos en el análisis de las interacciones genéticas existentes entre *ESD7* y los integradores florales *FT* y *SOC1*, generando los dobles mutantes entre *esd7-1*, *ft-1* y *soc1-1*. Los análisis de los dobles mutantes obtenidos en cualquier condición de fotoperiodo indican que *ESD7* no interaccionaría de forma independiente con los integradores florales *FT* y *SOC1* (figura 36).

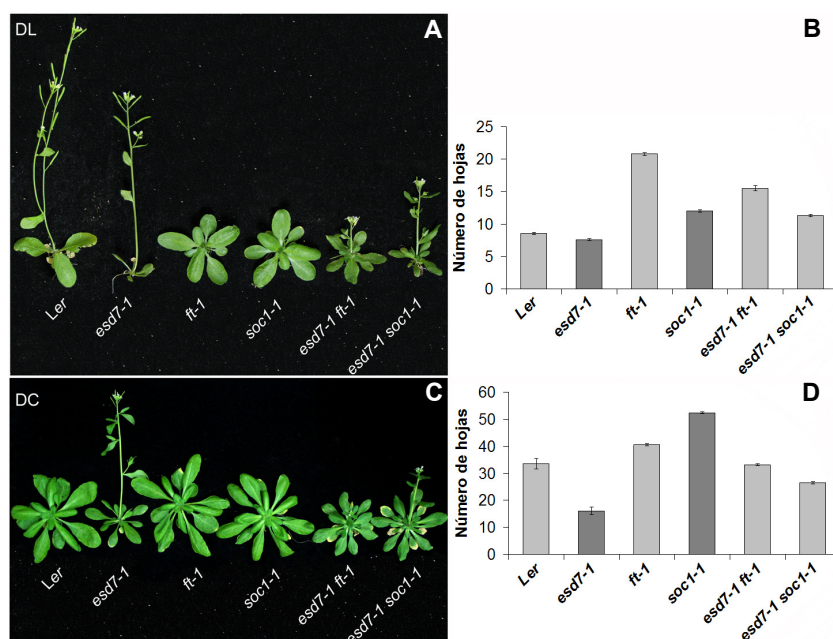


Figura 36. Fenotipo de floración de los mutantes *ft*, *soc1* y de los dobles mutantes correspondientes con *esd7-1*, analizados en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes.

Por otro lado, y dado que *FT* requiere de la función del gen *FD* para llevar a cabo la activación del gen *AP1* (Abe et al. 2005a), analizamos también la relación genética existente entre los loci *ESD7* y *FD*. El análisis del doble mutante *esd7-1 fd-1* en condiciones de DL y DC (figura 37) reveló que *ESD7* no interacciona genéticamente con el locus *FD*, ya que el tiempo de floración del doble mutante es intermedio entre los fenotipos observados con los mutantes sencillos.

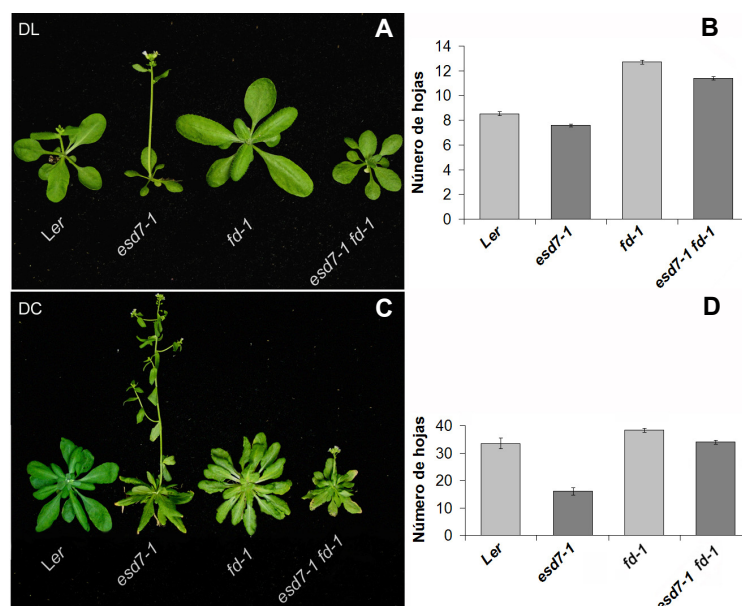


Figura 37. Fenotipo de floración del mutante *fd* y de los dobles mutantes correspondientes con *esd7-1*, analizados en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes.

No obstante, cabría la posibilidad de que *FT* y *SOC1* pudieran integrar en paralelo las señales provenientes de *ESD7* y aunque no está clara la relación genética existente entre *FT* y *SOC1*, a pesar de haberse propuesto la existencia de una regulación positiva de *FT* sobre *SOC1* (Schmid et al., 2003; Yoo et al, 2005; Michaels et al., 2005), consideramos oportuno comparar el fenotipo de floración del doble mutante *ft-1 soc1-1* con el fenotipo del triple mutante *ft-1 soc1-1 esd7-1* para poder corroborar esta hipótesis.

A la vista de los resultados mostrados en las figura 38, se podría afirmar que tanto *FT* como *SOC1* integrarían las señales procedentes de *ESD7*, ya que el triple mutante *ft-1 soc1-1 esd7-1* presenta un tiempo de floración similar al del doble mutante *ft-1 soc1-1* en cualquiera de las dos condiciones fotoperiódicas estudiadas. Por lo tanto, se puede concluir que *ESD7* requiere de proteínas *FT* y *SOC1* funcionales para llevar a cabo su función represora en el control del tiempo de floración.

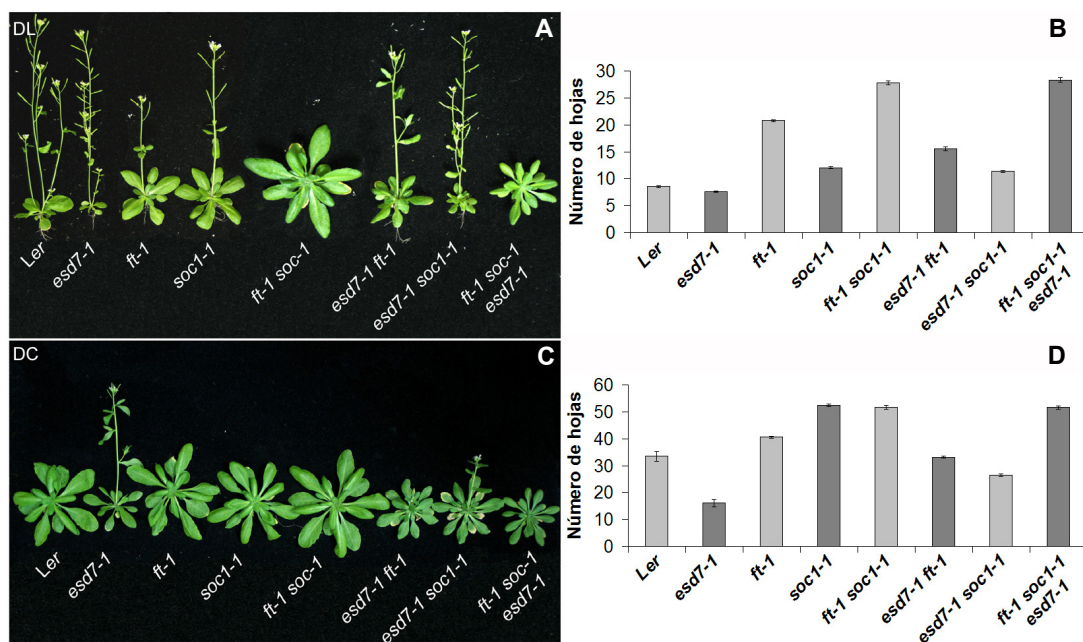


Figura 38. Fenotipo de floración de los mutantes *ft*, *soc1*, de los dobles mutantes correspondientes con *esd7-1* y del triple mutante *ft soc1 esd7*, analizados en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes.

36. Análisis de la posible interacción entre *ESD7* y los loci de identidad de meristemo floral *LFY*, *AP1* y de identidad de órgano floral *AG*.

Con el objeto de comprobar si *ESD7* podría intervenir a nivel de la identidad del meristemo floral y/o a nivel de la identidad de órgano floral, hemos generado los dobles mutantes entre *esd7-1* y los mutantes *lfy-5*, *ap1-1* y *ag-1*. El alelo *lfy-5* es un alelo débil que presenta, al igual que los alelos intermedios de este gen, una especificación errónea de la identidad del meristemo floral, que se manifiesta fenotípicamente en las primeras flores, las cuales poseen menos pétalos, estambres y a menudo flores secundarias en el interior de la flor principal (Weigel et al., 1992). El análisis del doble mutante *esd7-1 lfy-5* reveló una morfología floral y de la inflorescencia similar a la del mutante *lfy-5* (figura 39 B), si bien la morfología de las hojas y el tiempo de floración fueron idénticos a los del mutante *esd7-1* (figura 39 A y C). Por lo tanto se podría concluir que el doble mutante *esd7-1 lfy-5* presenta los fenotipos característicos de cada una de las mutaciones parentales y que ambos genes no interaccionarían.

De la misma manera, tanto los análisis realizados con el doble mutante *esd7-1 ap1-1* como los realizados con el doble mutante *esd7-1 ag-1* muestran que la morfología floral y de la inflorescencia son similares a las de los mutantes *ap1-1* o *ag-1* (figura 40 A y E, respectivamente), y también se comprueba que la morfología de las hojas y el tiempo de floración de los dobles mutantes son similares a los del mutante *esd7-1* (figura 40 A/C y D/F, respectivamente).

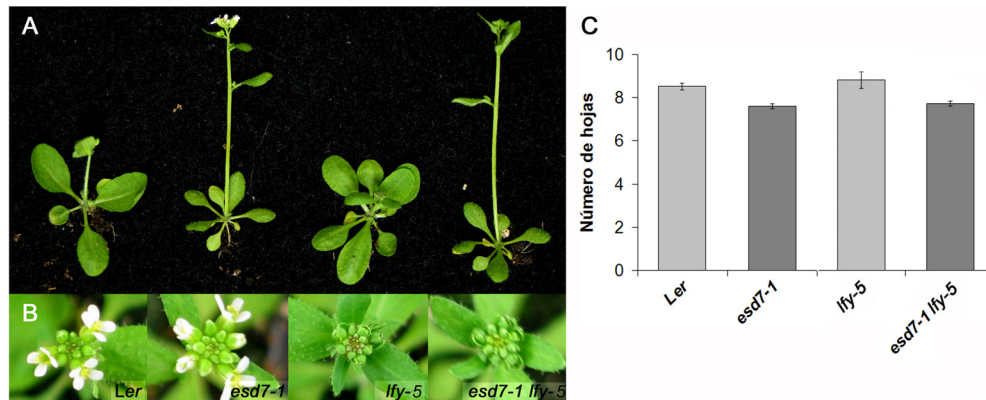


Figura 39. A: Fenotipo de floración del mutante *lfy-5* y del doble mutantes correspondiente con *esd7-1*, analizado en condiciones de DL. B: Fenotipo de la inflorescencia de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes; C: cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes.

Se podría concluir por lo tanto, que ambos genes no interaccionan con *ESD7* y que *ESD7* no tendría una función relevante en determinar la identidad del meristemo floral.

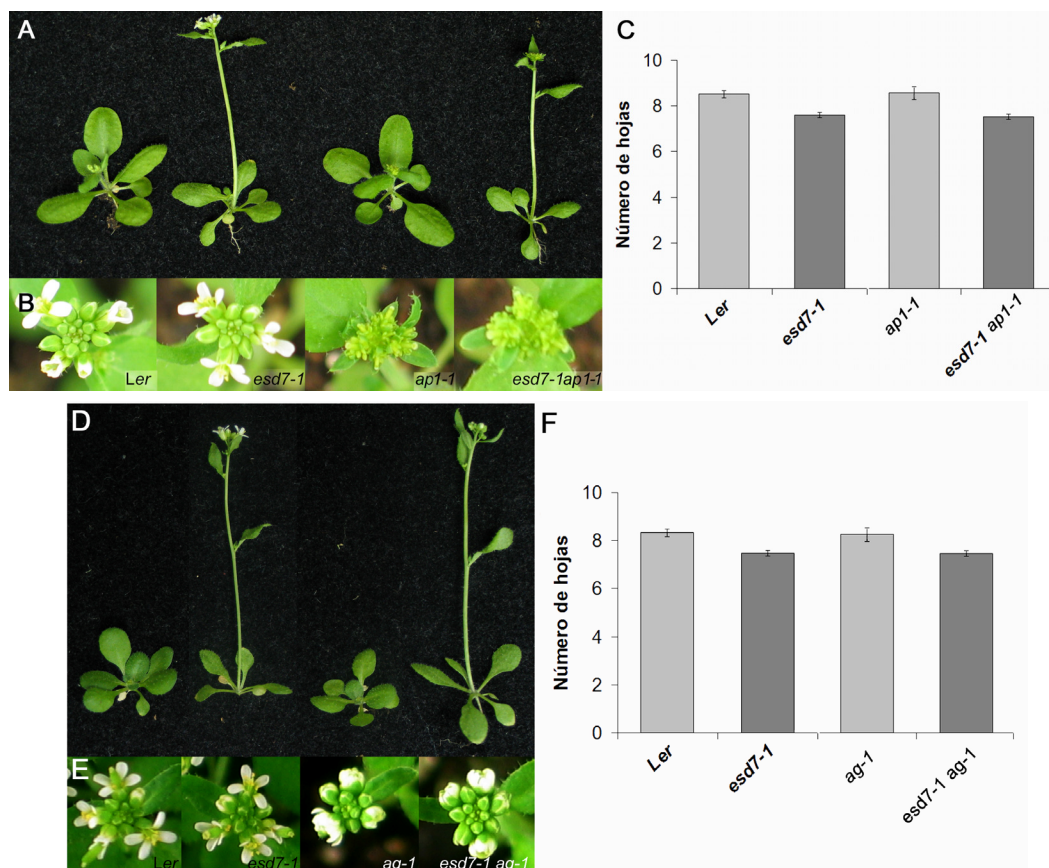


Figura 40. A: Fenotipo de floración de los mutantes *ap1-1* y *ag-1* y de los dobles mutantes correspondientes con *esd7-1*, analizados en condiciones de DL. B y E: Fenotipos de las inflorescencias de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes; C y F: cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes y dobles mutantes.

37. Análisis de la expresión de genes reguladores de la transición floral.

37.1. Análisis de la expresión de los genes de control del tiempo de floración *CO*, *FLC*, *FT* y *SOC1* en el mutante *esd7-1*.

Dado que la mutación *esd7* provoca una aceleración del tiempo de floración y los análisis de las relaciones genéticas establecidas con los dobles mutantes *esd7 ft* y *esd7 soc1* apuntan a que *ESD7* actúa tanto a nivel de *FT* como de *SOC1*, nos preguntamos si la mutación *esd7* podría afectar a los niveles de expresión de ambos genes o de otros genes que controlan la transición floral en *Arabidopsis* como *CO* y *FLC*.

Se ha demostrado que *FT* se expresa en las hojas en respuesta al fotoperiodo y que en condiciones de día largo, *CO* actúa como un activador transcripcional de *FT* (Suárez-López et al., 2001; Yanovsky y Kay, 2002; Hayama y Coupland, 2003). Por otro lado, se ha podido comprobar a través de experimentos de RT-PCR que en *Ler* el aumento de la expresión de *FT* comienza entre el sexto y el séptimo día de crecimiento en condiciones de DL (Kardailsky, et al, 1999). Con estas premisas, hemos analizado la expresión a lo largo del día de los genes anteriormente mencionados, empleando para ello plántulas cultivadas durante 7 días en condiciones de DL y tomando muestras cada cuatro horas hasta completar un ciclo de 24 horas (figura 40). De igual manera, hemos realizado experimentos similares con plántulas cultivadas durante 14 días en condiciones de DC, ya que es el momento en el que hemos observado un mayor aumento de la expresión de *FT*. Como se observa en la figura 40 A, los resultados obtenidos en condiciones de DL muestran que la expresión de genes tales como *CO* y *FLC* no se ve alterada de manera significativa en el mutante *esd7-1*, ya que el patrón de expresión diario y/o el nivel de expresión no se modifican de manera significativa con respecto a los detectados en la planta silvestre.

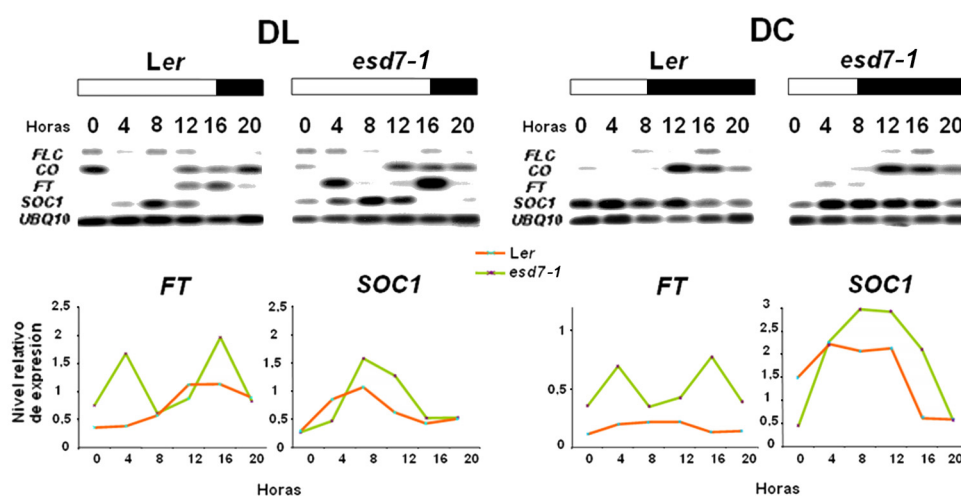


Figura 40. Análisis de la expresión de los genes *FLC*, *CO*, *FT* y *SOC1* en el mutante *esd7-1* durante un ciclo diario; las barras en blanco y negro representan la duración del día y la noche respectivamente en condiciones de DL (A) y DC (B). Cuantificación de los niveles relativos de expresión de *FT* y *SOC1*, en condiciones de DL (C) y de DC (D).

Con el fin de analizar si el patrón de expresión tisular de *FLC* se veía afectado en el mutante *esd7*, ya que la accesión de laboratorio *Ler* se caracteriza por poseer un alelo nulo de *FLC*, presentando unos niveles de expresión de este gen muy reducidos, llevamos a cabo el cruzamiento de *esd7-1* con una planta portadora de la construcción *FLC::uidA* en un fondo genético *fca-1*, donde los niveles de *FLC* se encuentran elevados (Sheldon et al., 2002).



Figura 41. Análisis de la expresión de *FLC* en el mutante *esd7-1*. A: Expresión del gen delator *uidA* dirigido por el promotor de *FLC* en plantas *fca-1*; B: o en plantas *fca-1 esd7-1*; C: expresión del gen *FLC* en plántulas *Ler* vs *esd7-1* y *fca-1* vs *fca-1 esd7-1*.

En la figura 41 A y B se aprecia que la expresión del gen delator *uidA* no varía significativamente entre la planta transgénica *fca-1 FLC::uidA* y el doble mutante *fca-1 esd7-1 FLC::uidA*. Por otro lado, el análisis mediante RT-PCR (figura 41 C), tampoco mostró un cambio significativo de expresión de *FLC* entre el mutante *fca-1* y el doble mutante *fca-1 esd7-1*, lo que confirma que *ESD7* no participa en la regulación de la expresión de *FLC*. Sin embargo, tanto el patrón de expresión diario como el nivel de expresión de los genes *FT* y *SOC1* (figura 40 A y B) se modifican significativamente en el mutante *esd7-1*, presentando aproximadamente tres veces más expresión para *FT* a las 4 horas del día y el doble de expresión al final del día, lo que podría explicar tanto el fenotipo temprano del mutante *esd7-1* como el fenotipo tardío del triple mutante *ft-1 soc1-1 esd7-1* en condiciones de DL. Por otro lado, los resultados obtenidos en condiciones de DC muestran un aumento de expresión de *FT* y una ligera variación en el patrón de expresión de este gen en el mutante *esd7*, en comparación con lo observado en planta silvestre (figura 40 B). Se sabe que la expresión de *FT* en condiciones de DC es baja y que mutantes tales como *ebs*, *tfl2* ó *toc1* muestran un incremento moderado de estos niveles de expresión (Yanovsky y Kay, 2002; Piñeiro et al., 2003; Takada y Goto, 2003). El aumento que hemos observado para *esd7* es inferior al mostrado por *tfl2* (Takada y Goto, 2003; del Olmo et al., 2009), pero comparable al mostrado por mutantes tales como *ebs* y *toc1* (Yanovsky y Kay, 2002; Piñeiro et al., 2003; del Olmo et al., 2009), y al igual que postulan Yanovsky y colaboradores para *toc1*, dichos cambios podrían ser responsables del fenotipo temprano de *esd7-1* en esas condiciones de fotoperiodo. Además, en el mutante *esd7-1* hemos detectado un incremento de la expresión de *SOC1*, que junto a los datos observados de la expresión de *FT*, nos llevan a postular que *ESD7* regularía la expresión de ambos loci. Con el objeto de precisar si la mutación *esd7* provoca un cambio en el patrón de expresión tisular de *FT*, llevamos a cabo cruzamientos del mutante *esd7-1* con una planta portadora de la construcción *FT::uidA* (Takada y Goto, 2003). En las plantas silvestres

portadoras de dicha construcción, la expresión del gen delator se detecta principalmente en los tejidos vasculares de los cotiledones, y conforme la planta se desarrolla, se detecta expresión en los tejidos vasculares de la parte apical de las hojas (figura 42; Takada y Goto, 2003). La expresión del gen delator *uidA* no es evidente en las venas principales o en las partes basales de las hojas, incluso en las plántulas maduras. Además, esta expresión no es continua en los tejidos vasculares, no detectándose expresión ni en los primordios de las hojas, ni en el SAM, ni en los hipocotilos o raíces. Sin embargo, al igual que ocurre con el mutante *tfl2* (Takada y Goto, 2003), *esd7-1* provoca un aumento de la expresión del delator *uidA* en comparación con la observada en plantas silvestres (figura 42).

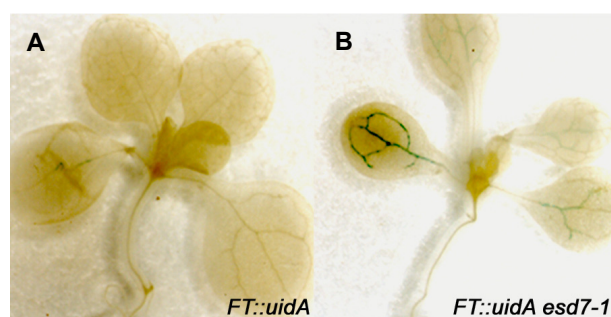


Figura 42. Análisis de la expresión del promotor de *FT* fusionado a *uidA* en el mutante *esd7-1* en comparación con el silvestre. A: plántulas Ler de 7 días de edad; B: plántulas *esd7-1* de 7 días de edad.

Los datos aportados por Takada y colaboradores en un mutante *tfl2* portador de la misma construcción, indican al menos el doble de actividad *GUS* en comparación con el tipo silvestre, localizadas en las venas primarias de los cotiledones, en las dos primeras hojas verdaderas y en el hipocotilo de plántulas de seis días de edad; de igual modo, los datos obtenidos para *esd7-1* ponen de manifiesto la existencia de un aumento de expresión que es menor que el observado para *tfl2*, detectándose un incremento de la expresión del delator en los cotiledones y un ligero aumento de la expresión del mismo en las dos primeras hojas verdaderas. Estos resultados indicarían que la expresión de *FT* está aumentada en el mutante *esd7-1* en comparación con el silvestre y que presenta una especificidad de tejido similar a la observada en plantas silvestres, lo que sugiere que la mayor expresión de *FT* en los tejidos vasculares de las hojas podría originar el fenotipo de floración temprana observado en este mutante.

37.2. *ESD7* no regula la expresión del gen *TWIN SISTER OF FT (TSF)*.

Como se ha comentado anteriormente, las vías que controlan la transición floral en *Arabidopsis* se integran mayoritariamente a nivel de la regulación de *FT* y *SOC1*, si bien otros genes tales como *TSF* también pueden actuar de forma parcialmente redundante con *FT* (Michaelis et al., 2005; Yamaguchi et al. 2005). *TSF* se induce rápidamente por CO (Yamaguchi et al. 2005). Además, los niveles de expresión a lo largo del día de *FT* y *TSF* muestran patrones similares de oscilación diurna y de respuesta fotoperiódica, con un pico de expresión por la tarde, con mayores niveles de expresión en condiciones de DL que en DC (Yamaguchi et

al. 2005) y un aumento inmediato de expresión cuando aumenta la duración de los días. Parece ser que la expresión de *TSF*, al igual que la de *FT*, esta regulada por *CO*, *FLC*, *EBS* y *PHYB*, lo que hace pensar que actúe en gran medida de forma redundante con *FT*, aunque tenga una mayor contribución a la inducción de la floración en condiciones de DC (el mutante *tsf-1* es tardío en DC) y regule parcialmente aguas arriba a *SOC1* e independientemente a *LFY* (Yamaguchi et al. 2005). Dado que nuestras observaciones sugieren un posible papel de *ESD7* en la regulación de *FT*, nos propusimos investigar si *ESD7* también podría actuar sobre la regulación de la expresión de *TSF*. Como se observa en la figura 43, las cinéticas de expresión no muestran una variación de los niveles de expresión de *TSF* entre el mutante *esd7-1* y las plantas silvestres en cualquier condición de fotoperiodo estudiada, lo que indica que probablemente *ESD7* no regule la expresión de *TSF*. Esta observación está de acuerdo con que el fenotipo temprano de *esd7* se suprima totalmente en un fondo doble mutante *ft soc1*.

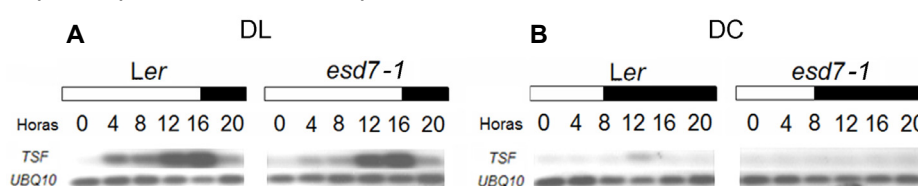


Figura 43. Análisis de la expresión de *TSF* durante un ciclo diario en plántulas del ecotipo *Ler* y en el mutante *esd7-1*; A: plántulas de 7 días de edad en condiciones de DL; B: plántulas de 14 días de edad en condiciones DC. Las barras en blanco y negro representan la duración del día y la noche respectivamente.

37.3. Análisis de la expresión de los genes *MAF* en el mutante *esd7-1*.

Además de *FLC*, otros genes parálogos tales como *MAF1/FLM* y los genes *MAF2-MAF5* también participan en el control de la vernalización y en otros aspectos de la regulación del tiempo de floración (Ratcliffe et al., 2001; Ratcliffe et al., 2003). El hecho de no haber observado relación genética alguna entre *ESD7* y los genes de la ruta autónoma analizados, tales como *FVE* y *FCA*, o el no haber detectado cambio alguno para la expresión de *FLC* en el mutante *esd7*, no nos permite descartar que *ESD7* esté implicado en la regulación de los genes *MAF*. Por ello analizamos la expresión de estos genes en el mutante *esd7-1* y pudimos comprobar que no muestran tampoco una variación significativa en comparación con la planta silvestre (figura 44), por lo que concluimos que *ESD7* tampoco regularía la expresión de los genes *MAF*.

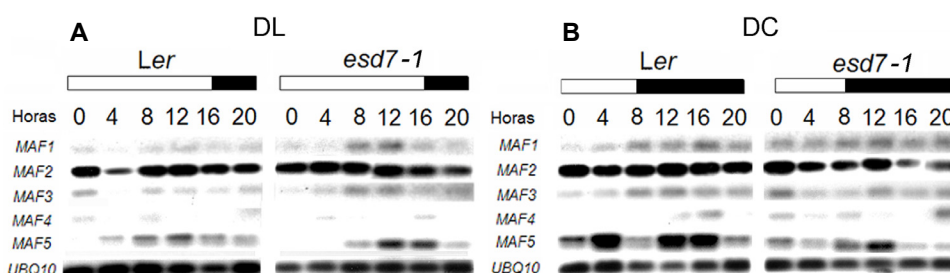


Figura 44. Análisis de la expresión de genes *MAF1-5* durante un ciclo diario en plántulas del ecotipo *Ler* y en el mutante *esd7-1*; A: plántulas de 7 días de edad en condiciones de DL; B: plántulas de 14 días de edad en condiciones DC. Las barras en blanco y negro representan la duración del día y la noche respectivamente.

38. Análisis de la posible interacción entre *ESD7* y diferentes loci que codifican proteínas relacionadas con procesos de remodelación de cromatina.

Son varios los trabajos que han puesto de manifiesto el papel central que desempeñan los procesos de remodelación de la cromatina en el establecimiento y mantenimiento de los patrones de expresión génica que gobiernan el desarrollo de las plantas (Jarillo et al., 2009). A través del análisis de diferentes mutantes de floración temprana se han identificado proteínas que reprimen la transcripción de genes que promueven la floración y en muchos casos, estas proteínas están formando parte de complejos represores de la transcripción relacionados con la regulación de la estructura de la cromatina (Birve et al., 2001; Gaudin et al., 2001; Kinoshita et al., 2001; Yoshida et al., 2001; Wagner y Meyerowitz, 2002; Kotake et al., 2003; Piñeiro et al., 2003; Farrona et al., 2008). Con el objeto de determinar una posible relación funcional entre la represión de la transición floral ejercida por *ESD7* y la llevada a cabo por otros loci implicados en la modulación de la dinámica estructural de la cromatina tales como *TFL2* y *EBS*, que al igual que *ESD7*, regulan negativamente la expresión de *FT* (Kotake et al., 2003; Piñeiro et al., 2003; Takada y Goto, 2003), hemos generado los dobles mutantes *esd7-1tfl2-1* y *esd7-1ebs-1*.

38.1. El locus *ESD7* interacciona sinérgicamente con el represor transcripcional *TFL2/LHP1*.

TFL2/LHP1 está implicada en la represión de genes eucromáticos y colocaliza con la marca de cromatina inactiva 3meK27H3, dependiente de la actividad de complejos PRC2, por lo que se le ha asignado un papel de mantenimiento estable de la represión génica similar al desempeñado por los complejos PRC1 de animales (Turck et al., 2007).

Las mutaciones en el locus *TFL2/LHP1* causan floración temprana y como puede observarse en la figura 45, el doble mutante *esd7-1 tfl2-1* desarrolla el mismo número de hojas antes de la apertura de la primera flor que el mutante *tfl2-1*. A pesar de esta observación, no podemos concluir que exista una interacción genética entre *TFL2* y *ESD7*, ya que en estas condiciones de fotoperiodo la ventana para analizar el tiempo de floración de estos mutantes tempranos es muy reducida, por lo que nos propusimos analizar su tiempo de floración en DC; en estas condiciones, pudimos observar que el doble mutante *esd7-1 tfl2-1* presenta un tiempo de floración más extremo que cualquiera de los dos parentales, por lo que se puede concluir que existe un sinergismo entre los loci *ESD7* y *TFL2/LHP1*. Así, el fenotipo del doble mutante sugiere que *ESD7* y *TFL2* poseen actividades separadas implicadas en el desarrollo de los meristemas y en la transición floral, aunque como ambas mutaciones presentan un fenotipo muy pleiotrópico y los dos loci regulan varios procesos generales del desarrollo, probablemente puedan compartir algunas funciones similares en el control del tiempo de floración. Por otro lado, si bien se ha descrito que el mutante *tfl2-1* tiene una sensibilidad muy reducida al fotoperiodo (Larsson et al., 1998), el doble mutante *esd7-1 tfl2-1* pierde totalmente la

sensibilidad al fotoperiodo, ya que florece igual de temprano en DL que en DC (figura 45). Dado que tanto *ESD7* como *TFL2* reprimen la expresión de *FT*, es probable que el doble mutante presente unos niveles de expresión elevados para *FT*, que le lleven a florecer independientemente de las condiciones fotoperiódicas.

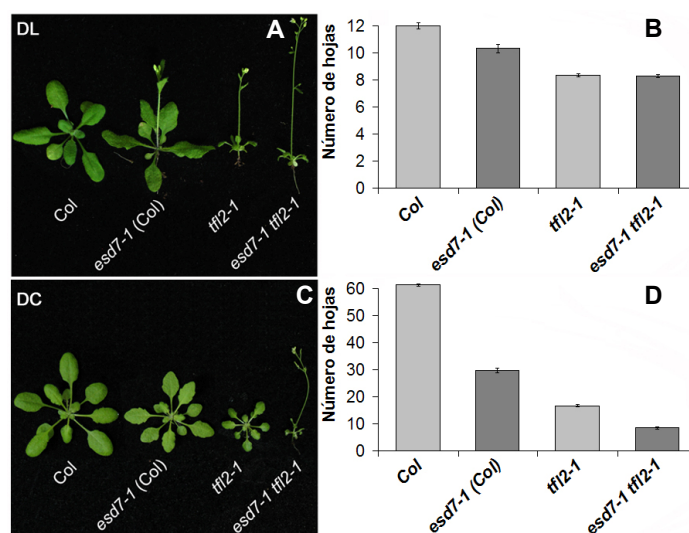


Figura 45. Fenotipo de floración del doble mutante *esd7-1 tfl2-1* analizado en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes sencillos y dobles mutantes; B, D: cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes sencillos y dobles mutantes.

38.2. Análisis de la expresión de los genes integradores florales *FT* y *SOC1* en el doble mutante *esd7-1 tfl2-1*.

Como se comentó anteriormente, el fenotipo de floración temprana de los mutantes *tfl2/lhp1* es el resultado de una mayor expresión de *FT* (Kotake et al, 2003). Por otro lado, la inestabilidad observada en los tratamientos de vernalización de los mutantes *tfl2/lhp1* es debida a la existencia de una represión inestable del represor floral *FLC* (Mylne et al., 2006; Sung et al., 2006). Además, *TFL2/LHP1* reprime la transcripción de genes que actúan en diferentes etapas de desarrollo reproductivo y los resultados de los análisis transcriptómicos realizados hasta el momento involucrándolo, apuntan a que *TFL2* pueda tener un papel más general en la regulación de otros muchos genes con funciones aún poco conocidas (Nakahigashi et al, 2005; Turck et al, 2007). El sinergismo observado entre los loci *ESD7* y *TFL2/LHP1* en el control del tiempo de floración nos llevó a analizar la expresión de los integradores *FT* y *SOC1* en el doble mutante *esd7-1 tfl2-1*. Con este propósito, realizamos un análisis de RT-PCR con plántulas de 11 días crecidas en DL, ya que en el ecotipo Col se ha comprobado que el aumento de la expresión de *FT* comienza entre el décimo y el decimosegundo día de crecimiento en estas condiciones de fotoperiodo (Kardailsky et al, 1999). De igual manera, realizamos este mismo experimento con plántulas crecidas durante 22 días en DC, puesto que previamente habíamos comprobado un aumento de la expresión de *FT* en dichas condiciones. Además, en este análisis determinamos la expresión de ambos genes en la cuarta y última hora del periodo iluminado (DL: 4h y 16h; DC: 4h y 8h), momentos en los que habíamos observado previamente

una mayor expresión de *FT* en el mutante *esd7-1*. Como se observa en la figura 46, el incremento de expresión de *FT* en el doble mutante *esd7-1 tfl2-1* es mayor que el observado en *tfl2-1* o en *esd7-1* en cualquier condición de fotoperiodo, lo que indica que tanto *ESD7* como *TFL2* podrían participar conjuntamente en la represión de *FT*. También se observa que en cualquier condición de fotoperiodo, el mutante *tfl2-1* posee una mayor expresión de *SOC1*, y que particularmente en DC, el doble mutante presenta un ligero aumento de la expresión de *SOC1* al final del día, con respecto a la planta silvestre.

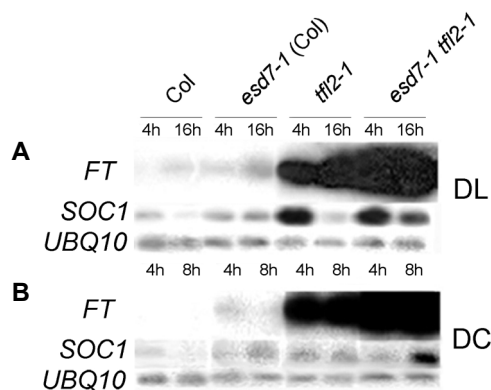


Figura 46. Análisis de la expresión de *FT* y *SOC1* en plántulas de Col, *esd7-1*, *tfl2-1* y *esd7-1tfl2-1*. A: análisis en plántulas de 11 días de edad en condiciones de DL; B: análisis en plántulas de 22 días de edad en condiciones de DC.

38.2.1. El dominio carboxi-terminal de la proteína ESD7 interacciona “*in vitro*” con la proteína TFL2/LHP1.

Desde que se demostró en *Drosophila* que el dominio CSD de la proteína HP1 se unía a un péptido pentamérico consenso, consistente en una prolina en posición -2, una valina en posición 0 y un residuo hidrofóbico en posición 2 (Smothers y Henikoff, 2000), se ha podido comprobar que la mayoría de las proteínas que interaccionan con HP1 contienen un motivo canónico PXVXL (Thiru et al., 2004). Además, esta secuencia consenso denominada MOD1-INTERACTING REGION (MIR), suele estar rodeada en posición -6 y 5 de residuos apolares (A, L, I, V, P, F, W y M) que aumentarían la fuerza de la interacción. Este dominio está presente en proteínas tales como TIF1 α , TIF1 β y TAF1130, que regulan la transcripción en mamíferos (Le Douarin et al., 1996; Ryan et al., 1999; Vassallo y Tanese, 2002), y en la subunidad p150 del complejo CAF-1 de humanos, que como ya se ha comentado, contribuye al ensamblaje de nucleosomas durante la replicación y reparación del DNA (Murzina et al., 1999; Quivy et al., 2004) (figura 47 A). Sin embargo, otras proteínas contienen un dominio MIR modificado (figura 47 B), que presenta una variación del residuo hidrofóbico en posición 2. Así, proteínas tales como la metiltransferasa Su(var)3-9 de *Drosophila* con especificidad por la lisina 9 de la histona H3 y que está implicada en la creación o el mantenimiento del silenciamiento génico (Schultz et al., 2002) ó la subunidad catalítica de la DNA polimerasa α , SWI7, de *Schizosaccharomyces pombe* (Ahmed et al., 2001; Nakayama et al., 2001), poseen este tipo de dominio MIR en su secuencia y se ha demostrado que interaccionan con HP1/SWI6 tanto *in vivo* como *in vitro*.

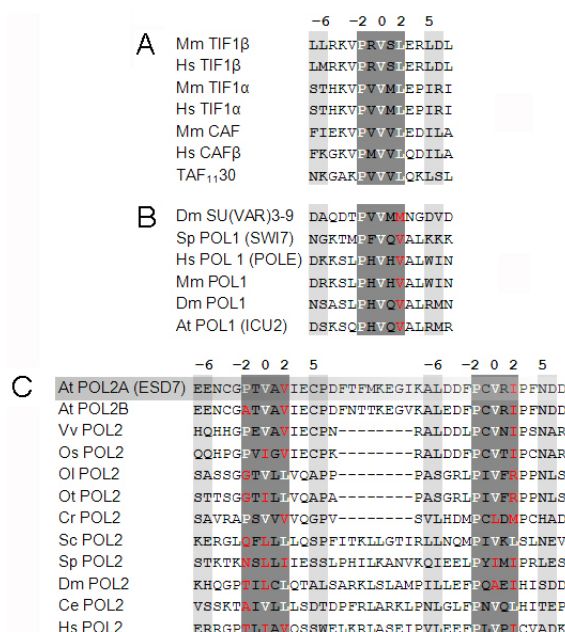


Figura 47. Comparación de secuencia del dominio MIR identificado en diferentes proteínas eucariotas. A: Dominio MIR consenso de diversas proteínas eucariotas. B: Modificaciones descritas para el dominio MIR en diferentes proteínas eucariotas. C: Comparación de los dominios MIR en diferentes proteínas tipo POL2 (ε). Se indican subrayados en gris los dominios MIR de AtPOL2a (V1548 vs V1582). Residuos en blanco: correspondencia de aminoácidos con el dominio MIR. Residuos en rojo: otros aminoácidos no canónicos de la secuencia MIR.

El hecho de que *ESD7* actúe de forma sinérgica con *TFL2/LHP1* en el control del tiempo de floración, participando de forma conjunta en la represión de *FT* (figuras 45 y 46) y que en *Arabidopsis*, la subunidad catalítica de la DNA polimerasa α interaccione tanto genética como molecularmente con TFL2/LHP1 (Barrero et al., 2007), sugerían la posibilidad de la existencia de algún tipo de interacción a nivel molecular entre las proteínas ESD7 y TFL2. El análisis de secuencia de la proteína ESD7 muestra en su dominio DUF1744 dos secuencias MIR no canónicas (PxVxV y PxVxl) centradas en las valinas V1548 y V1582 (figura 47 C). La secuencia centrada en la V1548 es muy similar a la que presentan otras polimerasas eucariotas; sin embargo, la secuencia centrada en el residuo V1582, además de mostrar una homología de secuencia mayor entre las diferentes especies de plantas superiores analizadas (At: *Arabidopsis thaliana*, Vv: *Vitis vinifera*, Os: *Oryza sativa*) y otras especies eucariotas, presenta en posición -6 residuos hidrofóbicos que estabilizarían la hoja β que se formaría en la estructura terciaria de la proteína (Thiru et al., 2004). Por lo tanto, es posible que alguno de estos dominios de ESD7 pudiera interactuar con el extremo CSD de LHP1.

Para determinar una posible interacción física entre ambas, llevamos a cabo un experimento de interacción proteína-proteína donde ensayamos la interacción directa (“pull-down”) entre la proteína recombinante purificada TFL2-GST y un producto de traducción in vitro (TNT) obtenido de la construcción POLA5-pGADT7, marcado con metionina radiactiva, utilizando un sistema con extracto de germen de trigo. La construcción POLA5-pGADT7 posee una secuencia que se transcribe a partir del promotor del fago T7 donde el epítipo HA está

fusionado a la secuencia contenida entre los residuos 1229 al 1782 de la región C-terminal de ESD7 y que contiene el dominio DUF1744. Aprovechando la afinidad de la “Glutathione-sepharose” para unir específicamente los productos con GST, incubamos TFL2-GST-sepharose con el producto de traducción del clón POLA5-pGADT7, que expresaba mayoritariamente una proteína de unos 65 KDa. Utilizamos como control positivo el extremo C-terminal de ICU2, ya que previamente se había demostrado su interacción con TFL2/LHP1 (Barrero et al., 2007; figura 48 A y B). De esta forma pudimos comprobar que la región C-terminal de ESD7 se une a TFL2/LHP1 *in vitro* (figura 48 B), de forma similar a la observada para la región C-terminal de ICU2.

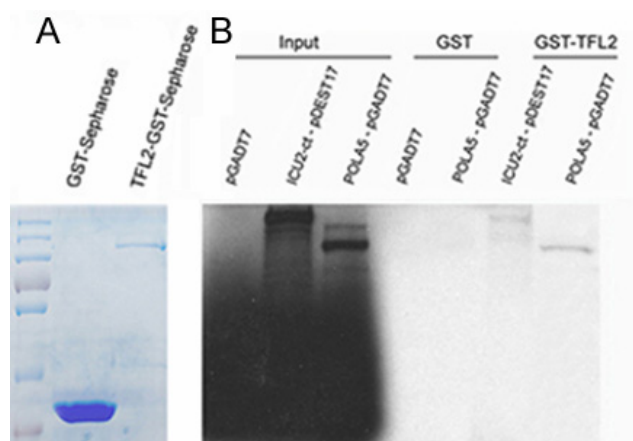


Figura 48. Ensayo "Pull-Down" que demuestra la interacción directa entre las proteínas TFL2 y ESD7. A) Control de carga del control negativo GST y TFL2-GST. B) Input: productos de expresión *in vitro* del control negativo pGADT7, control positivo ICU2-ct-pDEST17 y POLA5-pGADT7; GST: Controles negativos de unión a GST; GST-TFL2: Interacciones de control positivo ICU2-ct-pDEST17 y POLA5-pGADT7.

Hasta el momento no se ha descrito interacción molecular alguna entre un ortólogo de HP1 y la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ , siendo esta la primera demostración *in vitro*. Por lo tanto, este resultado nos permite hipotetizar acerca de la función que desempeña el extremo C-terminal de la DNA polimerasa ϵ en mecanismos de represión transcripcional mediados por HP1 y más concretamente en los mecanismos de represión de la transición floral en *Arabidopsis*. Por lo tanto, LHP1 podría funcionar como un adaptador que reúna a diferentes proteínas en complejos multiproteicos a través de las interacciones proteína-proteína y en *Arabidopsis* parece interaccionar con ESD7, de una forma similar a como se ha demostrado con otras proteínas de eucariotas.

38.3. Análisis de la posible interacción genética entre los loci *ESD7* y *EBS*.

EBS codifica una proteína con dominios implicados en el reconocimiento de marcas epigenéticas (Piñeiro et al., 2003), que participa en la regulación de varios procesos de desarrollo además del tiempo de floración; así, los mutantes *ebs* muestran diversas alteraciones fenotípicas que incluyen defectos en la morfología de inflorescencias y flores,

menor fertilidad y aumento en la expresión de genes de identidad de órgano floral (Gómez-Mena et al., 2001).

Como puede observarse en la figura 49, de nuevo la ventana para analizar el tiempo de floración del doble mutante *esd7-1 ebs-1* en DL, en comparación con los mutantes sencillos fue muy reducida. Sin embargo, en DC se observa que el doble mutante *esd7-1 ebs-1* presenta un tiempo de floración muy similar al observado para el mutante *esd7-1*, sugiriendo la existencia de una interacción genética de epistasia entre *ESD7* y *EBS*. Por otro lado, el hecho de que el doble mutante posea un fenotipo más extremo, presentando un menor tamaño de casi la totalidad de sus órganos, podría indicar un sinergismo entre ambos loci, por lo que postulamos que posiblemente *ESD7* y *EBS* posean actividades separadas implicadas en el desarrollo, si bien están implicados en el mismo mecanismo que regula la transición floral.

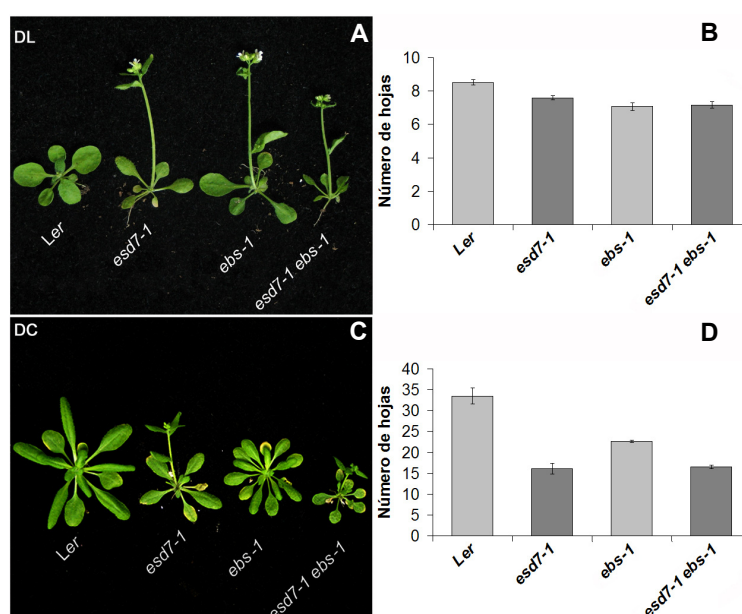


Figura 49. Fenotipo de floración del doble mutante *esd7-1 ebs-1* analizado en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes sencillos y dobles mutantes; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes sencillos y dobles mutantes.

38.4. Análisis de la expresión de los genes integradores florales *FT* y *SOC1* en el doble mutante *esd7-1 ebs-1*.

El locus *EBS* funciona en la represión de *FT*, especialmente en DC (Piñeiro et al., 2003) y la interacción genética observada con respecto al tiempo de floración entre los loci *ESD7* y *EBS* nos llevó a analizar la expresión de *FT* y *SOC1* en el doble mutante *esd7-1 ebs1-2*. Para ello realizamos un análisis de RT-PCR con plántulas de 7 y 14 días de edad, en DL y DC respectivamente, de forma similar al realizado anteriormente, ya que en este caso se utilizaron plántulas en fondo genético *Ler*. Como puede observarse en la figura 50, el incremento de expresión de *FT* en el doble mutante *esd7-1 ebs-1* es similar al observado tanto en *esd7-1* como en *ebs-1* en cualquier condición de fotoperíodo, lo que indicaría que *ESD7* y *EBS* participan en la misma ruta de represión de *FT*. Sin embargo, en el doble mutante *esd7-1 ebs-1*

la expresión de *SOC1* es similar a la observada en el mutante *esd7-1*, presentando un pico de expresión en la cuarta hora del día en DL y una mayor expresión al final del día en DC.

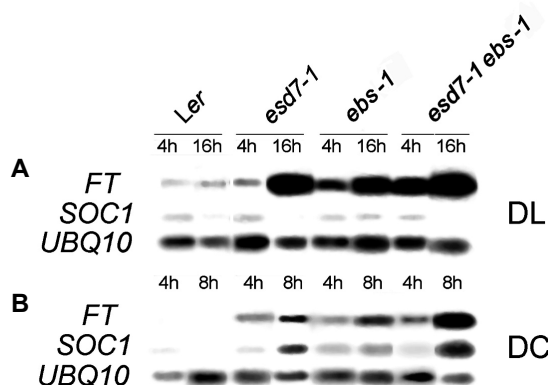


Figura 50. Análisis de la expresión de *FT* y *SOC1* en plántulas *Ler*, *esd7-1*, *ebs-1* y *esd7-1 ebs-1*. A: análisis en plántulas de 7 días de edad en condiciones de DL; B: análisis en plántulas de 14 días de edad en condiciones de DC.

Por lo tanto, en el doble mutante *esd7-1 ebs-1* no se ve alterado significativamente el nivel de expresión de *FT* y *SOC1* con respecto al mutante *esd7-1*. Esta observación, junto al hecho de que el doble mutante presente un tiempo de floración similar al de *esd7-1*, corroboraría la existencia de una interacción genética de epistasia entre los loci *ESD7* y *EBS* en el control del tiempo de floración.

39. Análisis de las interacciones entre *ESD7* y diferentes loci implicados en la replicación del DNA y en el ensamblaje de la cromatina.

La replicación del DNA y su posterior ensamblaje en los nucleosomas dependen de la acción coordinada de numerosos complejos proteicos (McNairn y Gilbert, 2003). La mayor parte de los estudios realizados hasta el momento se han llevado a cabo en levaduras y metazoos, mientras que no se han estudiado en profundidad los mecanismos que acontecen en las plantas. Tanto en levaduras como en humanos se ha propuesto que una vez que se establecen los orígenes de replicación, las DNA polimerasas α , δ , y ϵ , se colocan en las horquillas de replicación (Masumoto et al., 2000; Feng et al., 2003; Pavlov et al., 2004; Hiraga et al., 2005; Rytkönen, 2006). Presumiblemente, la acción conjunta de estas polimerasas durante la fase S del ciclo celular origina la duplicación del DNA; sin embargo otros procesos que ocurren asociados a la replicación, tales como los mecanismos de reparación del DNA y los mecanismos de ensamblaje de la cromatina, probablemente involucren a alguno de los factores que replican el DNA y participen a su vez en estos mecanismos. Así, la existencia de moléculas tales como PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA), una proteína que mantiene a las DNA polimerasas en el molde de DNA y asegura su procesividad durante la replicación del DNA, constituye un vínculo entre ambas funciones (McNairn y Gilbert, 2003). Igualmente, en levaduras, ciertas mutaciones en genes que codifican proteínas de replicación tales como PCNA, REPLICATION FACTOR C COMPLEX (RF-C), POL2 y CDC45, afectan al silenciamiento epigenético, pero no a la replicación del DNA (Ehrenhofer-Murray et al., 1999;

Zhang et al., 2000), lo que sugiere que estas proteínas juegan un papel importante en el establecimiento y/o mantenimiento de los estados epigenéticos, adicional a su función en la síntesis del DNA. Por lo tanto, se puede proponer que la replicación *versus* reparación del DNA y el ensamblaje de la cromatina sean procesos que ocurren simultáneamente y en regiones físicas muy cercanas (McNairn y Gilbert, 2003). Por todo ello nos propusimos analizar la posible interacción entre *ESD7* y algunos componentes de estos complejos descritos en *Arabidopsis*.

39.1. Análisis de la posible interacción genética entre los loci *ESD7* e *ICU2*.

ICU2 codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa α de *Arabidopsis* y el mutante hipomórfico *icu2-1* presenta un fenotipo de hojas pequeñas, rugosas y con un grado de incurvación variable (Barrero et al. 2007); además el mutante se caracteriza por poseer una dominancia apical reducida, floración temprana y sus flores presentan transformaciones homeóticas parciales de sépalos en carpelos y de pétalos en estambres (Barrero et al., 2007). Por otro lado, los alelos de pérdida de función para *ICU2* presentan al igual que los de *ESD7*, un fenotipo de letalidad embrionaria. Con el objeto de establecer la relación genética existente entre los loci *ESD7* e *ICU2*, hemos analizado el tiempo de floración en el doble mutante *esd7-1 icu2-1*, una vez introgresado el alelo *icu2-1* (En) en fondo genético Ler. Como puede observarse en la figura 51, el análisis del tiempo de floración en DL no permite establecer la relación genética existente entre ambos loci, debido a la poca diferencia observada para el tiempo de floración de los diferentes genotipos analizados. Sin embargo, en DC, se puede observar que el doble mutante *esd7-1 icu2-1* presenta el mismo tiempo de floración que el mutante *icu2-1*, lo que sugiere la existencia de una interacción genética entre *ICU2* y *ESD7*, si bien el doble mutante presenta un tamaño más reducido que el del mutante *icu2-1*.

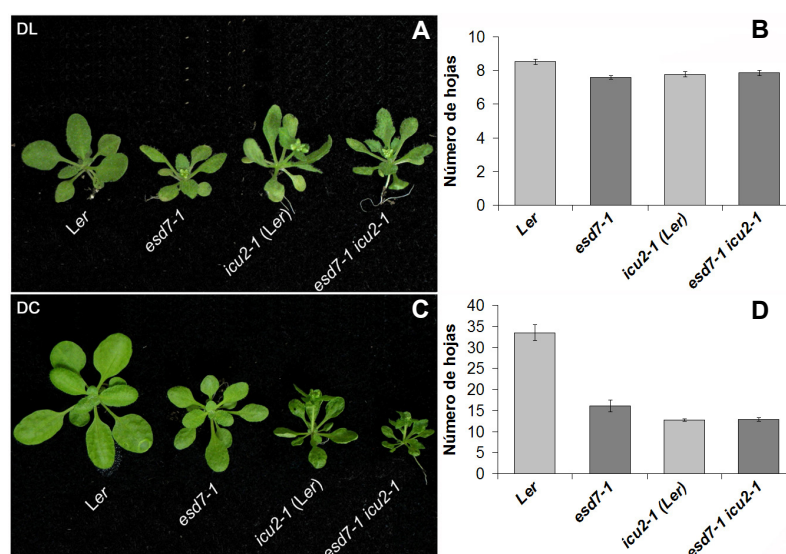


Figura 51. Fenotipo de floración del doble mutante *esd7-1 icu2-1* analizado en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes sencillos y dobles mutantes; B, D: cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes sencillos y dobles mutantes.

39.2. Análisis de la expresión de los genes integradores florales *FT* y *SOC1* en el doble mutante *esd7-1 icu2-1*.

ICU2 ha sido implicado en mecanismos de represión transcripcional de *FT*, *SOC1*, *AG*, y de genes de identidad de meristemo y de órgano floral (Barrero et al. 2007). Con el objeto de analizar a nivel molecular los niveles de expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1* en el mutante *icu2-1* y en el doble mutante *esd7-1 icu2-1*, realizamos un análisis de RT-PCR con plántulas de 7 y 14 días de edad, en DL y DC respectivamente (figura 50). Además, determinamos la expresión de ambos genes en la cuarta y última hora del día (DL: 4h y 16h; DC: 4h y 8h), de forma similar a los análisis previos realizados. Como puede observarse en la figura 52, el nivel de expresión de *FT* en *icu2-1* es mayor que el de *esd7-1* en cualquier condición de fotoperiodo y muestra diferentes patrones de expresión durante el día. Por otro lado, en condiciones de DL, sólo en el mutante *esd7-1* el nivel de expresión de *SOC1* es algo mayor que el de *Ler*, mientras que en DC la expresión de *SOC1* es más alta en *esd7-1* y en *icu2-1* en comparación con la planta silvestre. Sin embargo, en el doble mutante *esd7-1 icu2-1* se puede observar que en cualquier condición de fotoperiodo, la expresión de *SOC1* es similar a la encontrada en el mutante *icu2-1*. En este sentido, Barrero y colaboradores han observado un aumento significativo de los niveles de *SOC1* en el mutante *icu2-1* (Barrero et al. 2007), y nuestros análisis demuestran que esto ocurre preferentemente en condiciones de DC. Por otro lado, los datos obtenidos indican que en el doble mutante *esd7-1 icu2-1* no se ven alterados ni el patrón de expresión ni los niveles de expresión de los genes *FT* y *SOC1* con respecto a lo observado en el mutante *icu2-1*, presentando un pico de expresión a las 4 horas, similar al encontrado en el mutante *esd7-1* pero de mayor intensidad, y un pico de expresión aún mayor a última hora del día en cualquier condición de fotoperiodo. Estas observaciones junto al resultado anterior nos han llevado a postular la existencia de una relación genética de epistasia con respecto al tiempo de floración entre ambos loci, coincidente con la observación de que el doble mutante presente un tiempo de floración similar al de *icu2-1*. Por lo tanto, se puede concluir que ambos loci participan en la regulación de la expresión de *FT* y de *SOC1* a través de la misma ruta.

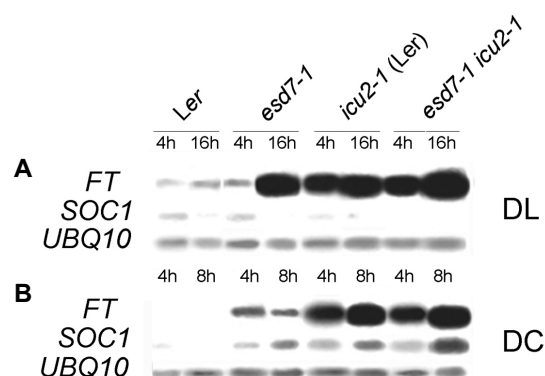


Figura 52. Análisis de la expresión de *FT* y *SOC1* en plántulas *Ler*, *esd7-1*, *icu2-1* y *esd7-1 icu2-1*. A: análisis en plántulas de 7 días de edad en condiciones de DL; B: análisis en plántulas de 14 días de edad en condiciones de DC.

39.3. La mutación *fas2* suprime el fenotipo de floración temprana de *esd7-1*.

En *Arabidopsis*, *fas1* y *fas2* son los únicos mutantes viables de pérdida de función de organismos multicelulares, correspondientes a dos de las subunidades (p150/CAC1 y p60/CAC2) del complejo CAF-1 de mamíferos y levaduras respectivamente (Kaya et al. 2001). Con el objeto de determinar una posible relación genética entre *ESD7* y componentes del complejo CAF-1, llevamos a cabo el cruzamiento de *esd7-1* con un alelo mutante de *FAS2* en fondo genético *Ler* (*fas2-1*). Como puede observarse en la figura 53, las características fenotípicas de la flor en el mutante *fas2-1* se mantienen en el doble mutante *esd7-1 fas2-1*, presentando alteraciones en órganos florales tales como extra sépalos y extra pétalos, en comparación con la flor de la planta silvestre.

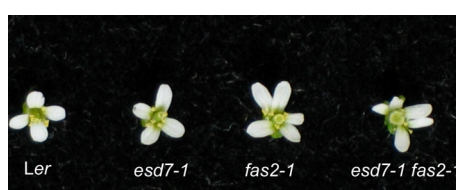


Figura 53. Morfología de la flor del mutante *esd7-1*, *fas2-1* y del doble mutante *esd7-1 fas2-1* en comparación con la flor silvestre.

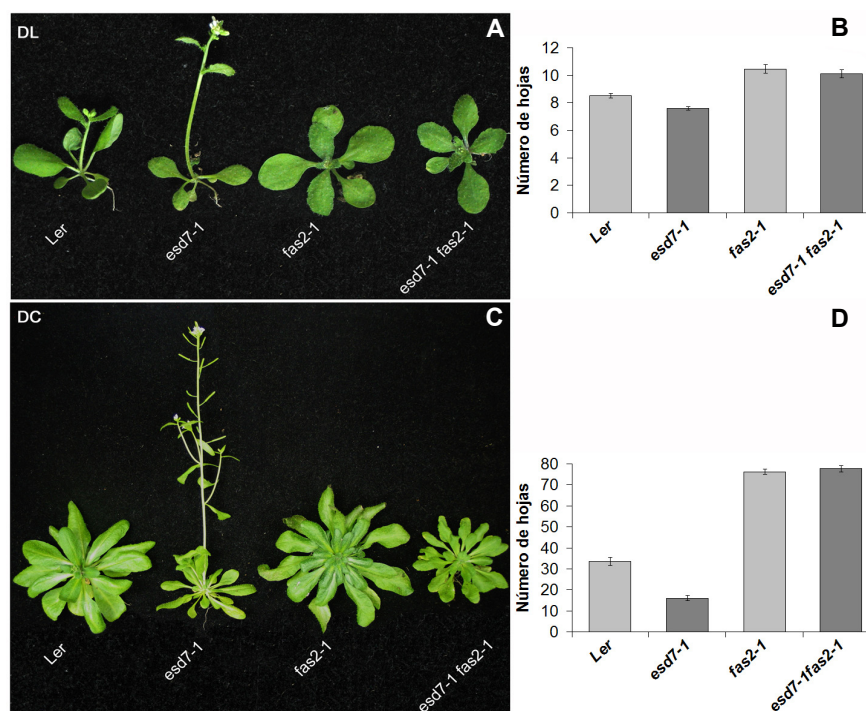


Figura 54. Fenotipo de floración del doble mutante *esd7-1 fas2-1* analizado en condiciones de DL y DC. A, C: fenotipo de las plantas silvestres, mutantes sencillos y dobles mutantes; B, D: Cuantificación del tiempo de floración de plantas silvestres, mutantes sencillos y dobles mutantes.

Por otro lado, el tiempo de floración del doble mutante *esd7-1 fas2-1* tanto en DL como en DC es tardío e idéntico al del mutante *fas2-1* (figura 54), lo que sugiere que *ESD7* y *FAS2*

interaccionan genéticamente, de tal manera que la actividad de *FAS2* sería necesaria para que *ESD7* realice su función, tanto en el control del tiempo de floración como durante el desarrollo de determinados órganos de la planta.

39.4. Análisis de la expresión de los genes integradores florales *FT* y *SOC1* en el doble mutante *esd7-1 fas2-1*.

Con el propósito de analizar los niveles de expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1* en el mutante *fas2-1* y en el doble mutante *esd7-1 fas2-1*, realizamos un análisis de RT-PCR similar al realizado anteriormente (figura 55). Así en el doble mutante *esd7-1 fas2-1* detectamos unos niveles de expresión de *FT* y *SOC1* similares a los observados en *fas2-1* en DL, siendo más bajos que los determinados en el mutante *esd7-1*. Por otro lado, el hecho de que en DL el fenotipo de floración de plantas *fas2-1* y *esd7-1 fas2-1* sea algo más tardío que el de Ler, se podría corresponder con la ligera reducción de los niveles de expresión de *FT* y *SOC1* observados en dichas plántulas, si bien el momento en el que fueron tomadas las muestras (7º día), es un intervalo de tiempo en el que es difícil encontrar claras diferencias de expresión con respecto a la planta silvestre.

En DC también se observa que tanto en plantas *fas2-1* como en *esd7-1 fas2-1*, los niveles de expresión de *FT* y *SOC1* son menores que los determinados en plántulas *esd7-1* y aunque los niveles de expresión de *FT* en estas condiciones de fotoperiodo son bajos como para establecer comparaciones, si que somos capaces de detectar una disminución significativa de los niveles de *SOC1* entre *fas2-1* y *esd7-1 fas2-1* en comparación con Ler, lo que en parte podría explicar el fenotipo de floración tardía de ambos tipos de plántulas en condiciones de DC.

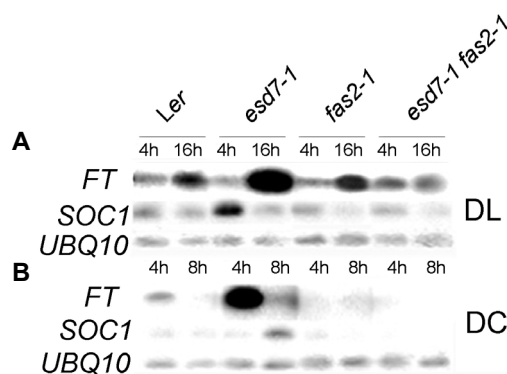


Figura 55. Análisis de la expresión de *FT* y *SOC1* en plántulas Ler, *esd7-1*, *fas2-1* y *esd7-1fas2-1*. A: análisis en plántulas de 7 días de edad en condiciones de DL; B: análisis en plántulas de 14 días de edad en condiciones de DC.

40. Análisis transcriptómico global del mutante *esd7-1* en condiciones de DC.

Con el objeto de tener una visión global de los genes que tienen alterada su expresión en el mutante *esd7-1*, hemos realizado un análisis transcriptómico con microordenamientos de Affymetrix (*Arabidopsis* ATH1 Genome Array) que contienen más de 22.500 sondas representativas de unos 24.000 genes de *Arabidopsis*. Este análisis se ha llevado a cabo por triplicado, con el RNA extraído de plantas silvestres *Ler* y mutantes *esd7-1*, cultivadas durante 14 días en condiciones de DC, en concreto en la última hora del periodo iluminado del día (8 horas). El diseño de este ensayo vino precedido de un ensayo transcriptómico similar a éste, pero con plantas crecidas durante 7 días en condiciones de DL, donde apenas observamos variación en la expresión de genes implicados en diferentes procesos de desarrollo entre el silvestre y el mutante, por lo que postulamos que los datos de expresión obtenidos en condiciones de DC nos podrían permitir abarcar un mayor número de genes implicados en el control del tiempo de floración. Para discriminar los genes cuyo nivel de expresión se veían modificados significativamente, se utilizaron valores de “*p-value*” de 0,05, que establece un 95% de confianza para los cambios detectados entre el mutante *esd7-1* y el tipo silvestre. Inicialmente se establecieron umbrales de “*fold change*” ≥ 2 para los genes sobre-expresados y $\leq 0,5$ para los genes reprimidos. Este análisis estadístico desveló 15 genes cuyo nivel de expresión se veía aumentado en el mutante *esd7-1* y 18 genes cuyo nivel de expresión se veía reprimido en comparación con el silvestre. Como puede observarse en la figura 56, los genes cuyas expresiones se ven aumentadas en el mutante *esd7-1* son principalmente dos retrotransposones (*SADHU4-2* y *AtRE1*), el gen de identidad de meristemo floral *SEPALLATA3* (*SEP3*) (Peláz et al., 2001), genes implicados en mecanismos de reparación del DNA y/o de respuesta a radiaciones ionizantes tales como *BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY1* (*ATBRCA1*), *ARABIDOPSIS POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE* (*APP*), *TSO2* y *XRI1* (Doucet-Chabeaud et al., 2001; West et al. 2004; Reidt et al., 2006; Wang y Liu, 2006; Dean et al., 2009), genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos (*KCS18*) (Todd et al., 1999) y el transporte de lípidos (*LPT2*) (Clark y Bohnert, 1999), el gen *CBL-interacting protein kinase 11* (*CIPK11*) implicado en la respuesta a estrés salino (Park y Kim, 2007) y *NIMA-RELATED KINASE3* (*ATNEK3*), un gen implicado en la regulación del ciclo celular y en procesos de desarrollo tales como la vascularización (Doucet-Chabeaud et al. 2001). Además, entre los cinco genes de función desconocida que presentan un aumento de su expresión en el mutante *esd7*, se incluye uno que codifica una proteína de la familia C3HC4 RING finger (Kosarev et al., 2002) y otro gen en el que se ha observado un aumento de expresión por exposición a estrés salino (*AT2G23270*; Ma et al. 2006). Por su parte, los genes cuya expresión se ve reprimida de manera notoria en el mutante *esd7-1* son: *OBP3-RESPONSIVE GENE 2-3* (*ORG2*, *ORG3*; *BHLH100*, *BHLH101*), implicados en la respuesta a estrés por deficiencia de hierro y que ven reprimida su expresión por un exceso de este oligoelemento (Wang et al. 2007b); *ATR2* (*AT5G46760*), que codifica un factor de transcripción de la familia bHLH, implicado en la ruta de síntesis del triptófano y en las respuestas al estrés mediadas por SA, ácido metil-jasmónico

(MeJA) y ABA (Smolen et al. 2002); *DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1 B (DDB1B)*, implicado en diversos aspectos del desarrollo como la embriogénesis y probablemente en mecanismos de reparación del DNA (Schroeder et al., 2002); *RNA POLYMERASE SIGMA (SIGE)*, que codifica un factor de transcripción del cloroplasto implicado en embriogénesis y en las respuestas a luz roja y roja lejana (Allison, 2000 ; Yao et al. 2003; Tepperman et al. 2006), genes implicados en las respuestas al estrés biótico o abiótico (*AT2G43620*; *DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1*, *DIR1* y *PHOSPHATE-INDUCED 1*, *PHI-1*) (Gong et al., 2001; Maldonado et al., 2002; Rizhsky et al., 2004), en la transducción de señales mediadas por hormonas (*ARF-GAP DOMAIN 9*, *AGD9*) (Vernoud et al., 2003), en la homeostasis del hierro (*FERRIC REDUCTION OXIDASE 3*, *FRO3*) (Wu et al., 2005), en el transporte de bases nitrogenadas (*PUP1*) (Gillissen et al., 2000), y en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (*ADRENODOXIN-LIKE FERREDOXIN 1*) (Takubo et al., 2003).



Figura 56. Genes identificados en el análisis transcriptómico que tienen desregulada su expresión en el mutante *esd7-1* (p -value = 0.05; $0.5 \geq \text{fold change} \geq 2$). De izquierda a derecha se indica el *Fold Change* o valor numérico del cambio de expresión, locus y el nombre de cada gen junto con su actividad y función, en caso de conocerse.

Puesto que *ESD7* se expresa preferentemente en tejidos con división celular activa, es posible que el uso de plántulas completas en los análisis transcriptómicos subestime los cambios en los niveles de expresión observados; probablemente por ello, obtenemos un bajo número de genes que muestran un cambio elevado entre el silvestre y el mutante *esd7-1*. Por esta razón, hemos realizado otro abordaje del ensayo con el objeto de dotarle de una mayor significación biológica, utilizando unos valores de “*fold change*” menos restrictivos. De esta manera, fijando un “*fold change*” ≥ 1.5 para los genes sobre-expresados y ≤ 0.35 para los

genes reprimidos, obtuvimos un total de 87 genes cuyo nivel de expresión se veía aumentado y 165 genes cuyo nivel de expresión se veía reprimido en el mutante *esd7-1*, lo que significa un cambio de expresión aproximadamente del 1% del total de los genes analizados. Como puede observarse en la figura 57, los genes que modifican su expresión en mayor medida serían: genes que codifican proteínas implicadas en la regulación de la expresión génica (9,5%), de los cuales la mitad estarían activados; genes implicados en procesos de modificación post-traducciona de proteínas (7,5%; 31% activados); genes implicados en procesos de oxido-reducción y genes implicados en la respuesta al estrés biótico y abiótico (7,1% y 6,7% respectivamente; 48% activados); genes implicados en el metabolismo de lípidos (4,8%; 20% activados); genes implicados en la transducciones de señales endógenas y medioambientales (3,6%; 11% activados); genes implicados en el metabolismo de la pared celular (3,6%; 44% activados); genes implicados en procesos de desarrollo (3,2%; 50% activados) y genes implicados en el transporte de péptidos y proteínas (2,8 %; 40% activados).

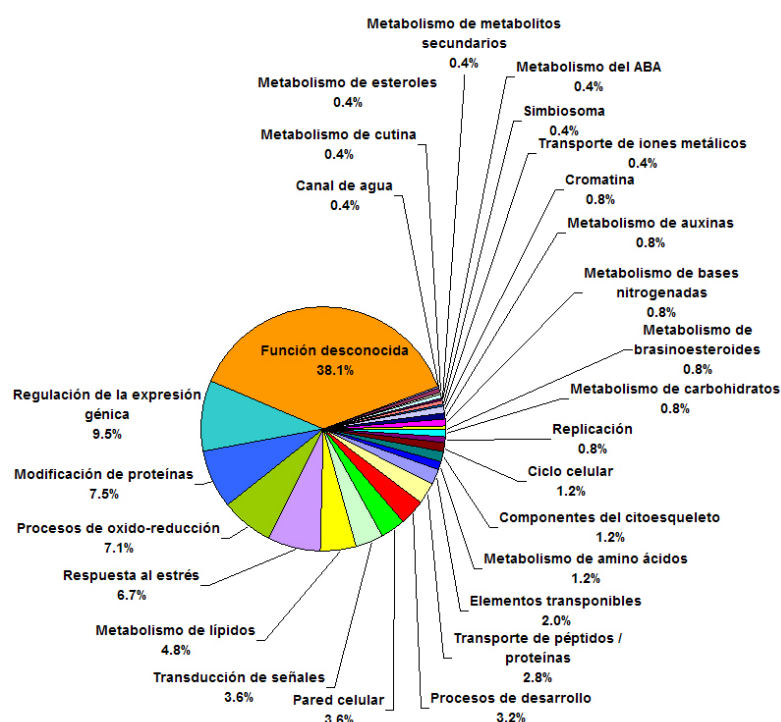


Figura 57. Estadística de la función desempeñada por los genes que tienen desregulada su expresión en el mutante *esd7-1* (valores establecidos en el análisis *p-value* = 0.05; $0.35 \geq \text{fold change} \geq 1.5$).

Cada una de las funciones desempeñadas por el resto de genes contribuirían al estado transcriptómico del mutante *esd7-1* entre un 2%-0,4% y podrían agruparse en genes con funciones que ven aumentado y reprimido su nivel de expresión, tales como determinados genes implicados en el metabolismo de azúcares, amino ácidos, bases nitrogenadas y genes que codifican proteínas histónicas; en genes con funciones que ven aumentado su nivel de expresión, tales como elementos transponibles, genes implicados en la síntesis de metabolitos secundarios, en el transporte de iones metálicos, en replicación del DNA y en el ciclo celular. Por último, aparecen genes con funciones que ven reprimido su nivel de expresión, como ciertos genes implicados en el metabolismo del ABA, auxinas, brasinoesteroides y esteroides.

Además, es importante mencionar que el 37% de genes con funciones desconocidas, es decir, el 14 % de los genes que ven modificado su nivel de expresión en el mutante, se han relacionado con procesos de respuesta al estrés biótico o abiótico.

Con el objeto de analizar el comportamiento de otros genes implicados en el control del tiempo de floración, que presentasen un cambio de expresión en fondo mutante *esd7-1*, realizamos un análisis similar al anterior pero fijando valores de “*fold change*” entre $2 > \text{fold change} \geq 1.13$, para genes que presentasen un aumento de expresión y un intervalo $0.89 > \text{fold change} \geq 0.5$, para los que presentasen una disminución de su expresión en el mutante *esd7-1* (figura 58).

Fold Change		NOMBRE	FENOTIPO DE LA MUTACIÓN /	FUNCIÓN DESEMPEÑADA
0.0	1.0	2.0		
1.77		GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 7	FLORACION TARDIA	
1.59		GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN 8	FLORACION TARDIA	
1.41		SEPALLATA1 (AGL2) (SEP1)	IDENTIDAD DE ORGANO FLORAL	
1.38		GIBBERELLIN 3-BETA-DIOXY/HYDROXY (GA4)	FLORACION TARDIA	
1.36		(FKF1) / ADAGIO 3 (AD03)	FLORACION TARDIA	
1.33		GIBBERELLIN 20-OXIDASE	FLORACION TARDIA	
1.27		GIBBERELLIN-REGULATED PROTEIN 4	ACTIVA GENES DE MERISTEMO FLORAL	
1.23		SHATTERPROOF 1 (AGL1)	IDENTIDAD DE ORGANO FLORAL	
1.21		PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5 (APRR5)	LA SOBREE/PRESION PROVOCA FLORACION TEMPRANA	
0.76		REDUCED VERNALISATION RESPONSE 1	MENOR RESPUESTA A VERNALISACION	
0.71		CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)	LA SOBREE/PRESION PROVOCA FLORACION TARDIA	
0.71		SPINDLY	FLORACION TEMPRANA	
0.62		WITH NO K 2, WNK2, SIK3	FLORACION TEMPRANA	

Figura 58. Genes identificados en el análisis transcriptómico, implicados en el control del tiempo de floración, que tienen desregulada su expresión en el mutante *esd7-1* ($p\text{-value} = 0.05$; $2 > \text{fold change} \geq 1.13$; $0.89 > \text{fold change} \geq 0.5$). De izquierda a derecha se indica el valor medio de del \log_2 de la señal normalizada para cada sonda obtenida de tres experimentos independientes, en *Ler* y *esd7-1* respectivamente; valor medio del \log_2 del ratio entre las señales normalizadas para cada sonda; *Fold Change*; Nombre del gen y fenotipo de la mutación o función desempeñada.

Hemos comprobado que entre los genes implicados en el control de la floración con expresión aumentada en el mutante *esd7-1* se encuentran los genes *GRP7* y *GRP8*, que codifican dos proteínas homólogas que funcionan con el oscilador circadiano regulando negativamente su propia expresión y la de genes como *FLC* (Streitner et al., 2008); *PRR5* y *FKF1*, que participan en la inducción transcripcional de *CO* (Imaizumi et al., 2005; Nakamichi et al., 2007); *SEPALLATA 1* (*SEP1*) y *SHATTERPROOF* (*SHP1*), implicados en la identidad de órgano floral (Flanagan et al., 1996; Peláz et al., 2000); *GASA4*, un gen de respuesta a GAs que codifica una proteína de función desconocida implicada en la regulación de genes de identidad del meristemo floral (Roxrud et al., 2007); y *GA4* y *GA20ox* implicados en la biosíntesis de GAs (Phillips et al., 1995; Chiang et al., 1997). Por su parte, entre los genes implicados en el control de la floración que ven disminuida su expresión en el mutante *esd7-1* se encuentran *WNK2*, que codifica una proteína quinasa de función desconocida (Wang et al., 2007c); *SPY*, implicado en la transducción de señales mediadas por GAs (Jacobsen et al., 1996); *CDF1* que participa en la inducción transcripcional de *CO* (Nakamichi et al., 2007); y *VRN1* que codifica uno de los represores necesarios para el mantenimiento de la respuesta a vernalización (Levy et al., 2002).

En paralelo, siguiendo una aproximación de RT-PCR y utilizando RNA de plantas cultivadas durante 14 días en condiciones de DC, en concreto en la 4ª y 8ª hora del periodo iluminado, hemos comprobado que en el mutante *esd7-1* existe una desrepresión significativa de la expresión de genes de identidad de órgano floral tales como *SHP1*, *SEP1*, y *SEP3*, y de otros genes que no presentan la suficiente significación estadística en el microordenamiento tales como los genes de identidad de meristemo *AG* y *SEP2*, y el gen integrador floral *AGL24* (figura 56). Además, como control de los análisis realizados previamente, utilizamos sondas para los genes integradores florales *FT* y *SOC1*, ya que éstos están fuera del intervalo de confianza en el microordenamiento (figura 59), determinándose igualmente que su expresión está aumentada en el mutante. Por lo tanto, se podría afirmar que *ESD7* participa en los mecanismos de regulación de la expresión de los genes analizados, indicando que el microordenamiento ensayado muestra únicamente un momento concreto de la situación transcriptómica del mutante *esd7-1* y que la significación de este análisis podría variar en otro momento del desarrollo como es en la cuarta hora del día, donde para el mutante se observa un mayor nivel de expresión de *FT*.

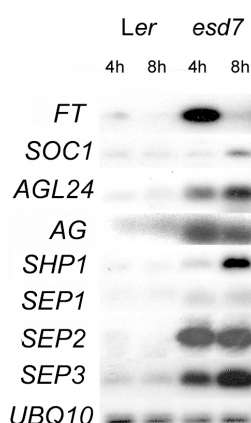


Figura 59. Análisis de la expresión de los integradores *FT*, *SOC1*, *AGL24* y de los genes de identidad de meristemo floral *AG*, *SHP1*, *SEP1*, *SEP2* y *SEP3* en plántulas *Ler* y *esd7-1* de 14 días de edad crecidas en condiciones de DC. Se tomaron muestras a las 4 y 8 horas del periodo iluminado del día.

41. Análisis de la expresión del gen *AG* y de algunos homólogos *AGL* en dobles mutantes *esd7 icu2*, *esd7 tfl2* y *esd7 fas2*.

Resultados mostrados con anterioridad en este trabajo han puesto de manifiesto la interacción existente entre *ESD7* y genes tales como *ICU2*, *FAS2* y *TFL2* (Figuras 45-55). Existen evidencias de que tanto *ICU2* como *TFL2* regulan, entre otros, la expresión de *AG* y *SEP3* (Kotake et al., 2003; Barrero et al. 2007), y que *ESD7* reprime la expresión de *AG*, *AGL24* y de los genes de identidad de meristemo floral *SHP1*, *SEP1*, *SEP2* y *SEP3*. Por ello hemos realizado un análisis en el que determinamos el nivel de expresión en condiciones de DC de *AG*, *AGL24*, *SHP1* y *SEP1-3* en los dobles mutantes *esd7 icu2*, *esd7 tfl2* y *esd7 fas2*. Como puede observarse en la figura 60, en condiciones de DC, los niveles de expresión de los

genes *AG*, *SHP1* y *SEP2-3*, en el doble mutante *esd7-1 tfl2-1* son básicamente la suma de sus expresiones en los mutantes sencillos (no así para *SEP1* ni *AGL24*), lo que apoyaría el hecho de que *ESD7* funcione de forma conjunta a *TFL2*. Con respecto al doble mutante *esd7-1 icu2-1*, puede observarse que el nivel de expresión de *AGL24* es similar al encontrado en *icu2-1*, si bien los niveles de expresión de cada uno de los demás genes analizados parecen ser una combinación de las expresiones encontradas en los mutantes sencillos. Este resultado contrastaría con el hecho de que el doble mutante presente un fenotipo más extremo, aunque el tiempo de floración sea similar al de *icu2-1*. Por lo tanto, los resultados de expresión obtenidos con los genes *FT*, *SOC1* y *AGL24* para dicho doble mutante reafirmarían que *ESD7* e *ICU2* regulen conjuntamente a los integradores de la floración y por otra parte, posean funciones independientes que regulen a otros genes, como son los genes de identidad de meristemo floral aquí analizados.

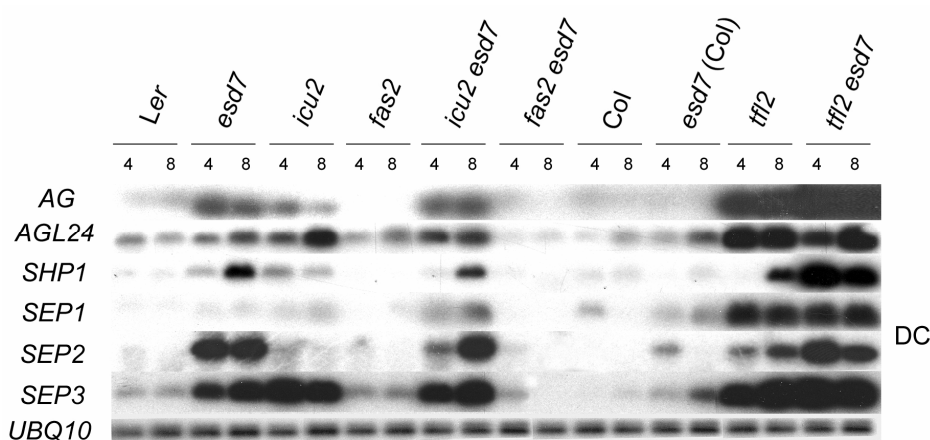


Figura 60. Análisis de la expresión de *AG* y diferentes genes *AG-like* (*AGL24*, *SHP1*, *SEP1*, *SEP2* y *SEP3*) en combinaciones de dobles mutantes entre *esd7-1* y los mutantes *icu2*, *tfl2* y *fas2*, de 14 días de edad, cultivados en condiciones de DC. Se tomaron muestras a las 4 y 8 horas del periodo iluminado del día.

Por otro lado, los niveles de expresión del gen *AG* y de otros genes *AG-like* (*AGL24*, *SHP1*, *SEP1*, *SEP2* y *SEP3*) analizados en el doble mutante *esd7-1 fas2-1* son similares a los encontrados en el mutante *fas2-1*, con lo que podríamos concluir que la función del gen *FAS2* es necesaria para que *ESD7* reprima la expresión de estos genes.

42. Regiones discretas de la cromatina de los loci *FT* y *AG* están enriquecidas en las marcas epigenéticas activadoras Ac-H3 y trimetil-H3K4 en el mutante *esd7-1*.

Las interacciones genéticas entre *ESD7*, *TFL2*, *EBS*, *FAS2* e *ICU2* descritas anteriormente, así como la desrepresión de los diferentes genes analizados que se observa en el mutante *esd7-1*, sugieren que *ESD7* juegue un papel a nivel del silenciamiento transcripcional, que podría estar relacionado con los estados epigenéticos de la cromatina de dichos genes. Así por ejemplo, se han descrito diversas modificaciones asociadas a estados transcripcionalmente activos de la cromatina de *FLC*, como son la hipertrimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (trimetil-H3K4) o bien la acetilación de la lisina 9 y/o 14 de la histona H3 (acetil-H3K9 y K14),

características de las variedades de invierno de *Arabidopsis* que no han sido vernalizadas (He et al., 2003; Ausín et al., 2004; He et al., 2004; Kim et al., 2005b; Martín-Trillo et al., 2006). Por otro lado, se ha descrito que en el mutante *icu2-1* se produce un aumento significativo de los niveles de acetilación (acetil-H3, acetil-H3K9 y acetil-H3K14) de ciertas regiones de la cromatina del gen *AG*, aunque no existen grandes diferencias en los patrones de metilación en la cromatina de ese locus entre el mutante *icu2* y la planta silvestre (Barrero et al., 2007). Con el fin de determinar si la mutación *esd7* podría alterar el establecimiento de marcas epigenéticas asociadas a estados transcripcionalmente activos, hemos realizado un análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos que reconocen α -acetil H3K9K14 y α -H3K4me3 y analizado regiones discretas de los loci *FT* y *AG* (figura 61 A y B), ya que como demostramos anteriormente, *FT* es una de las dianas principales de *ESD7* en el control del tiempo de floración, y la expresión de *AG* podría estar regulada conjuntamente por *ESD7* e *ICU2* para determinar la identidad de meristemo floral. Como se observa en la figura 61 B, la región Z1 de la cromatina del locus *FT* presenta mayores niveles de acetilación y de metilación de la histona H3 (acetil-H3K9/K14 y H3K4me3, respectivamente) en el mutante *esd7-1* que en la planta silvestre. Sin embargo, cuando se llevó a cabo el mismo análisis con la zona Z2 de la región promotora, sólo se observó un ligero incremento en los niveles de acetilación de histona H3 en el mutante *esd7*, mientras que los niveles de H3K4me3 permanecieron invariables con el DNA inmunoprecipitado del mutante y de la planta silvestre. Estos datos podrían sugerir que las diferencias de expresión encontradas para el gen *FT* entre el mutante *esd7-1* y la planta silvestre, se podrían deber, en parte, a los diferentes niveles de acetilación y metilación observados en esa región de la cromatina de la región promotora de *FT*.

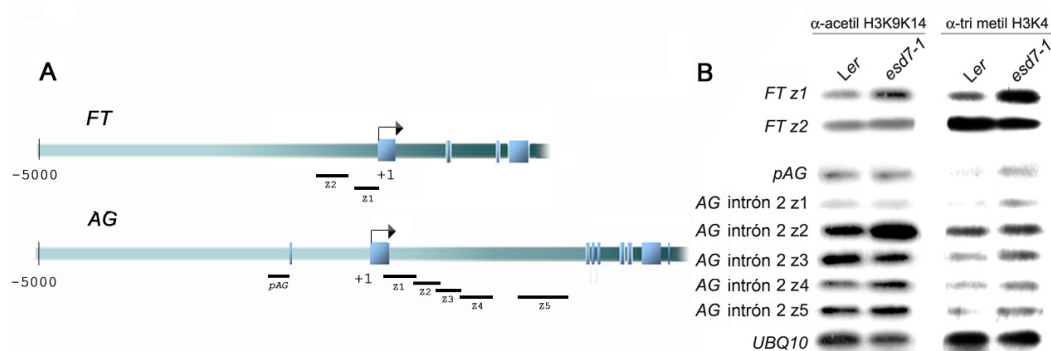


Figura 61. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y análisis de regiones discretas de la cromatina de los loci *FT* y *AG*, utilizando los anticuerpos α -acetil H3K9K14 y α -trimetil H3K4. A. Esquema de la estructura genómica de *FT* y *AG*, indicando las zonas analizadas para cada locus. B. Ensayos de RT-PCR para regiones discretas de la cromatina de *FT* y *AG*, utilizando como molde DNA inmunoprecipitado de Ler y de *esd7* con los anticuerpos indicados. Como control del ensayo se utilizó *UBQ 10*.

De igual manera hemos determinado los niveles de acetilación y de metilación de la histona H3 en diferentes regiones de la cromatina del locus *AG*, concretamente del promotor y del intrón 1, usando como molde DNA inmunoprecipitado del mutante *esd7-1* y de la planta silvestre, con anticuerpos específicos que reconocen esas marcas epigenéticas. En la figura 61 B se pueden observar mayores niveles de acetilación de la histona H3 en el DNA

inmunoprecipitado del mutante *esd7-1* que en el de la planta silvestre, para las regiones discretas analizadas del locus *AG*, al igual que ocurre en el mutante *icu2-1* (Barrero et al., 2007). En paralelo, hemos encontrado cambios sutiles, aunque generalizados, en los niveles de H3K4me3 de las mismas regiones analizadas, básicamente en la región del promotor y en las zonas Z1 a Z5. Por lo tanto se podría postular que las diferencias detectadas en los niveles de las marcas epigenéticas analizadas en el locus *AG* podrían ser consistentes en parte, con el aumento de expresión de este gen observado en el mutante *esd7-1*.



DISCUSIÓN

Detalle del fenotipo de las flores y fasciación del tallo
de la inflorescencia de una línea interferente de *ESD7*

43. Aislamiento de *esd7-1*, un mutante de floración temprana con alteraciones fenotípicas pleiotrópicas tanto en caracteres vegetativos como reproductivos.

El aislamiento y caracterización de mutantes de floración temprana está permitiendo identificar genes implicados en la represión de la transición floral y dilucidar los mecanismos moleculares por los que participan en el control de este proceso. Sin embargo, las colecciones de mutantes de floración temprana generadas hasta el momento muestran que un gran número de represores están involucrados en este proceso del desarrollo vegetal (Sung et al., 2003; Pouteau et al., 2004), y sugieren la necesidad de continuar abordando aproximaciones de genética directa e inversa encaminadas a aislar nuevos loci implicados en la represión floral. Un ejemplo reciente lo constituye una colección de 61 mutantes de inserción de T-DNA con un fenotipo de floración temprana, en la cual se han seleccionado 49 mutantes que presentan una respuesta fotoperiódica dispar y que no habían sido aislados en escrutinios previos (Pouteau et al., 2008). Por otro lado, el alto grado de pleiotropía que presentan muchos de estos mutantes de floración temprana, hace pensar que la represión de la floración sea sólo una de las funciones desempeñadas por los genes correspondientes (Pouteau et al. 2004), propiciando que muchos de los escrutinios de mutantes encaminados a aislar genes implicados en procesos tales como el desarrollo foliar y radicular, entre otros, desvelen también su implicación en el control de la transición floral y viceversa (Barrero et al., 2007; del Olmo et al., 2009). Además, queda aún por esclarecer como muchos de estos represores generales del desarrollo interaccionan con reguladores claves de la transición floral, lo que hace necesaria una descripción detallada de cómo estos represores se integran en el modelo conceptual del control del tiempo de floración.

A través de rastreos de diferentes colecciones mutagenizadas de *Arabidopsis*, encaminados a la identificación de mutantes que presentasen un fenotipo de floración temprano, hemos aislado entre otros, el mutante *esd7-1*, que además de una aceleración de la floración, presenta otras alteraciones fenotípicas como la forma lanceolada y ligeramente rugosa del limbo de sus hojas o la disminución del tamaño de la mayoría de sus órganos aéreos (figura 14 y 16); de igual manera, *esd7-1* presenta un menor desarrollo de la raíz principal y una drástica reducción de la duración de la fase vegetativa adulta (figura 17). Estas alteraciones son características de *esd7-1*, pero muestran similitudes con las observadas en otros mutantes tempranos, tales como *clf* (Goodrich et al., 1997), *tfl2* (Larsson et al., 1998; Gaudin et al., 2001; Kotake et al., 2003), *fie* (Katz et al., 2004) e *icu2* (Bürger, 1971; Serrano-Cartagena et al., 2000; Barrero et al. 2007), afectados en proteínas que participan en mecanismos de remodelación de cromatina, lo que nos sugería antes de su clonación molecular que *ESD7* probablemente jugaría un papel como componente o como regulador de procesos básicos de la maquinaria celular.

44. *ESD7* codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ , una proteína que podría formar parte de un complejo homólogo a la DNA polimerasa ϵ de levaduras en *Arabidopsis*.

Siguiendo una aproximación de cartografiado hemos determinado que el alelo *esd7-1* es portador de una mutación puntual localizada en el exón 26 del gen que codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ (AtPOL2a) (figura 7A), y posteriormente hemos demostrado que el fenotipo mutante de *esd7-1* se revierte por transformación genética con una construcción portadora del locus silvestre *ESD7* (figura 6).

De las 15 DNA polimerasas eucariotas que usan como molde DNA (Weill y Reynaud, 2008), tres de ellas Pol α , Pol δ y Pol ϵ se encuentran en el núcleo del proceso de copia y trabajan de manera concertada para duplicar el genoma (Stillman, 2008; Burgers, 2009). Análisis genéticos recientes han contribuido a aclarar como estas tres polimerasas coordinan el proceso (Pursell et al., 2007b; Nick-McElhinny et al., 2008). La DNA polimerasa ϵ de *Saccharomyces cerevisiae* está constituida por un complejo proteico de cuatro subunidades con masas moleculares de 256, 80, 34 y 29 kDa, codificadas por los genes *POL2*, *DPB2*, *DPB3* y *DPB4* respectivamente (Hamatake et al., 1990; Morrison et al., 1990; Araki et al., 1991a; Araki et al., 1991b; Ohya et al., 2000; Chilkova et al., 2003; Pursell y Kunkel 2008). Las tres subunidades de menor tamaño forman una estructura extensible que interacciona, a través de una bisagra flexible, con el gran dominio globular formado por la subunidad catalítica POL2 (Asturias et al., 2006), existiendo evidencias de que el complejo puede formar un dímero *in vivo* (Dua et al. 2000; Chilkova et al., 2003). Esta polimerasa se ha implicado funcionalmente en la replicación (Bell et al., 2002; Garg y Burgers, 2005; Pursell y Kunkel 2008) y reparación del DNA (Alexander et al., 2002; Nyberg et al. 2002; Pursell et al., 2007a; Pursell y Kunkel 2008), en procesos de remodelación de la cromatina (Dua et al. 2000; Li et al. 2000; Poot et al. 2000; Tsubota et al., 2006; Pursell y Kunkel 2008) y en mecanismos de silenciamiento transcripcional (Ehrenhofer-Murray et al, 1999; Tsubota et al., 2006; Pursell y Kunkel 2008) (figura 63).

La subunidad catalítica POL2 de *Saccharomyces* tiene una estructura similar a la de otras polimerasas eucariotas de la familia B de DNA polimerasas (Araki et al., 1992; Braithwaite et al. 1993; Edgell et al., 1997), aunque posee un dominio C-terminal notablemente mayor, de función aún desconocida, y que representa algo más de la mitad del peso molecular total de la subunidad (Huang et al. 1999). El dominio C-terminal abarca desde el dominio DNA polimerasa hasta el dominio terminal tipo dedo de zinc (figura 9). En este sentido, *ESD7/AtPOL2a* presenta un 79% de identidad (84% de similitud) con AtPOL2b y un 60% (71% de similitud) con su homólogo de arroz (*Oryza sativa*); sin embargo, presenta únicamente un 37% de identidad (55% de similitud) con POL2 de *Saccharomyces cerevisiae* y un 41% (57% de similitud) con el homólogo POLE1 de *Homo sapiens*, siendo la identidad del dominio N-terminal mayor que la del C-terminal (figura 9). El extremo N-terminal de la subunidad catalítica contiene la actividad

polimerasa de DNA y la actividad correctora de errores o exonucleasa 3'→5', mientras que el extremo C-terminal es necesario para la formación de complejos con las subunidades más pequeñas a través del dominio terminal tipo dedo de zinc (Araki et al., 1992; Braithwaite et al. 1993; Edgell et al., 1997).

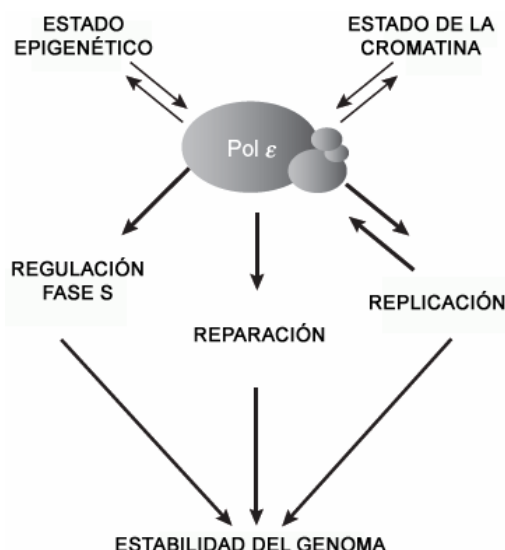


Figura 63. Pol ϵ interviene en diversos procesos celulares; la dirección y tamaño de las flechas pretende reflejar la influencia e importancia relativa de su participación en cada proceso. En primer lugar, presenta una función en la replicación de la cadena de síntesis directa; sin embargo, algunos datos sugieren que si bien es importante para la replicación, su función esencial sería la de "sensor" durante el punto de control G1/S. También está implicada en la reparación del DNA, aunque su especificidad en este proceso no está clara. Contribuye al estado de la cromatina, ayudando al mantenimiento epigenético de un estado silenciado. Además, como las modificaciones epigenéticas pueden ser diana de Pol ϵ las flechas son bidireccionales. La interacción de Pol ϵ con otros factores implicados en la remodelación de la cromatina, así como la fidelidad de copia intrínseca y otras propiedades bioquímicas, desempeñan un papel importante a lo largo de cada uno de estos procesos. Por lo tanto, su implicación en la progresión del ciclo celular, en la replicación y reparación del DNA, así como su papel en los estados epigenéticos de la cromatina son objetivo general del mantenimiento de la estabilidad del genoma. (Esquema modificado a partir de Pursell y Kunkel 2008).

El gen *POL2* es esencial para la viabilidad en levaduras (Morrison et al. 1990, Araki et al. 1992, Budd y Campbell 1993, D'Urso y Nurse 1997, Sugino et al. 1998), ya que mutaciones puntuales *pol2* en el dominio C-terminal causan fenotipos termosensibles, no pudiéndose replicar el DNA cromosómico a temperaturas restrictivas. Asimismo, las interacciones del dominio C-terminal con otras subunidades del complejo o con factores implicados en ciclo celular y remodelación de la cromatina, pueden variar entre diferentes especies (Sugino et al., 1998); en *Schizosaccharomyces pombe*, la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ (CDC20) no rescata las mutaciones *pol2* de *Saccharomyces cerevisiae* y viceversa. Por otro lado, sorprende el hecho de que este dominio C-terminal sea suficiente para la viabilidad de la célula, mientras que los dominios polimerasa y exonucleasa sean prescindibles (Dua et al. 1999; Feng y D'Urso 2001; Kesti et al. 1999), a pesar de haberse comprobado que el dominio N-terminal es importante tanto para la fidelidad de copia como para la integridad estructural y la

organización de la horquilla de replicación (Dua et al. 1999; Pursell et al., 2007a). Todas estas observaciones han llevado a proponer dos modelos posibles sobre el papel de la DNA pol ϵ en la replicación, bien en la síntesis de la hebra directa del DNA (Pursell et al., 2007b), donde colocaliza con otras polimerasas tales como la DNA polimerasa α (Pavlov et al., 2004, Rytönen 2006), o bien en una función más especializada en la replicación de la heterocromatina (Fuss et al. 2002). El hecho de que tanto las mutaciones puntuales en el dominio N-terminal de POL2 como la ausencia total de los dominios catalíticos no comprometan la viabilidad de la levadura, junto a la cooperación existente entre las diferentes polimerasas en la horquilla de replicación, sugieren que esta polimerasa posea una función redundante en la síntesis del DNA con respecto a otras polimerasas, haciendo que determinadas funciones de la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ sean prescindibles, mientras que otras, presuntamente implicadas en mecanismos de remodelación y mantenimiento de la cromatina, sean indispensables.

Los alelos mutantes de *Arabidopsis* aislados para *ESD7*, portadores de inserciones de T-DNA en intrones del extremo N-terminal, interrumpen la secuencia de la proteína, provocando letalidad embrionaria (figura 7A); de igual manera, los alelos de inserción de T-DNA *salk_1143* y *emb_2284_2*, portadores de inserciones en los intrones 47 y 48, también son letales embrionarios y teóricamente carecen del dominio terminal tipo dedo de zinc de ESD7 (Tzafrir et al., 2004), que como se ha comentado, está implicado en las interacciones con las otras subunidades del complejo y es esencial para la viabilidad en levaduras (Dua et al., 1999). Por lo tanto, parece existir cierta similitud en la función desempeñada por este dominio entre *Arabidopsis* y levaduras. Por otro lado, tanto la mutación *esd7* como *til1* producen cambios en residuos conservados en la mayoría de las polimerasas de la familia B (Huang et al., 1999; Jenik et al, 2005; este trabajo), y los estudios de predicción de estructura secundaria para la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ de *Arabidopsis* revelan que ambas mutaciones provocarían cambios importantes en el dominio N-terminal, que alterarían fundamentalmente la función polimerasa y parte de la función exonucleasa correctora de errores (figuras 9 y 29). Sin embargo, hasta el momento no sabemos como estas mutaciones podrían afectar al dominio C-terminal, ya que se desconoce en detalle su estructura.

Por su parte, la subunidad reguladora del complejo, DPB2, está implicada en la homodimerización del enzima (Dua et al. 2000) e interacciona con el dominio terminal tipo dedo de zinc de POL2 (Dua et al., 1998), funcionando conjuntamente con esta subunidad en la síntesis de DNA en ausencia de las otras subunidades más pequeñas (Dua et al. 2000). Recientemente, se ha demostrado en humanos que esta subunidad (DPOE2) presenta un dominio N-terminal con una estructura muy similar a la encontrada en las proteínas de la familia AAA+ de ATPasas (Nuutinen et al., 2008), implicadas en mecanismos de ensamblaje/desensamblaje de complejos proteicos (Neuwald et al., 1999; Hanson y Whiteheart, 2005) y en el metabolismo del DNA (Neuwald, 2005). En *Arabidopsis* también se

ha demostrado que el dominio C-terminal de ESD7 interacciona *in vitro* con AtDPB2 (Ronceret et al., 2005) y nosotros hemos comprobado a través de complementación bimolecular de fluorescencia, que dicha interacción tiene lugar *in vivo* en el núcleo de la célula vegetal (figura 28), lo que reforzaría la hipótesis de que en *Arabidopsis* exista un complejo formado por ambas subunidades, similar al descrito en levaduras.

Por otro lado, al igual que los mutantes de pérdida de función para la subunidad catalítica, la pérdida de función de *DPB2* es esencial para la viabilidad en levaduras (Araki et al., 1991a; Li et al., 1997). Como en el caso de los mutantes puntuales *pol2* del dominio C-terminal de la subunidad catalítica, los mutantes *dpb2* de levaduras son termosensibles y también presentan una morfología celular típica de los mutantes en la replicación, siendo parcialmente defectuosos en la síntesis de DNA, lo que sugiere que esta subunidad también juega un papel en la replicación del DNA (D'Urso et al., 1995; MacNeill et al., 1996; Feng et al., 2003). Nosotros hemos comprobado que en *Arabidopsis*, la pérdida total de función presente en el alelo de T-DNA aislado para el gen *AtDPB2*, presenta un fenotipo de letalidad embrionaria, que ha sido relacionado con el desarrollo de los gametofitos femenino y masculino (Ronceret et al., 2005). Sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado ningún alelo de pérdida parcial o de ganancia de función de este gen en *Arabidopsis*, que permita revelar una nueva función del mismo durante el desarrollo.

Los genes *DPB3* y *DPB4* codifican las dos subunidades más pequeñas del complejo y no son esenciales para la viabilidad en levaduras (Araki et al. 1991b; Ohya et al. 2000); sin embargo, tanto en los mutantes *pol2* como en los mutantes de pérdida de función *DPB3* y/o *DPB4*, existe un defecto en el mantenimiento del silenciamiento transcripcional de genes localizados en las regiones teloméricas, sin que exista un defecto en el establecimiento de los nuevos estados silenciados de la cromatina que acontecen en cada división celular (Araki et al. 1991b; Ohya et al. 2000). El mecanismo molecular que subyace a estas observaciones es difícil de entender, pero se ha comprobado que las subunidades *DPB3* y *DPB4* contienen un motivo estructural originalmente descrito en histonas (Li et al., 1997; Li et al. 2000; Ohya et al., 2000), que normalmente participa en la interacción entre histonas y/o entre las histonas y el DNA (Arents y Moudrianakis, 1995). Así por ejemplo, existen reguladores de la transcripción y factores remodeladores de la cromatina, tales como CCAAT-BOX BINDING PROTEIN (CBP), NF-Y (NF-Y/CBF) y CHROMATIN ACCESSIBILITY COMPLEX (CHRAC) (Maity et al., 1998; Mantovani, 1999; Corona et al., 2000; Li et al., 2000; Poot et al., 2000), que presentan motivos histónicos muy similares a los encontrados en estas dos subunidades y en concreto, la estructura de los factores de transcripción NF-YC y NF-YB, homólogos a *DPB3* y *DPB4* respectivamente, se asemeja a la del dímero de histonas formadas por H2A y H2B (Romier et al., 2003); de hecho se ha comprobado que el dímero formado por *DPB3/DPB4* interacciona con el DNA de forma muy similar a como lo hacen las histonas H2A y H2B (Tsubota et al., 2006). Nuestra búsqueda de putativos ortólogos en el genoma de *Arabidopsis* para los genes

DPB3 y *DPB4*, al igual que la realizada por otros grupos de investigación (Jenik et al. 2005; Ronceret et al., 2005; Shultz et al., 2007), resultó infructuosa, identificándose en base a similitud de secuencia una familia de proteínas histónicas que incluía componentes de los nucleosomas, así como un elevado número de factores de transcripción del tipo CBP (CBF/NFY), si bien estamos analizando mutantes de inserción de T-DNA para los loci *At5g50490* y *At1g09030*, homólogos a *DPB3* y *DPB4* respectivamente, con el objeto de identificar si la pérdida total de función para dichos genes pudiera tener implicaciones en el control del tiempo de floración.

En el genoma de levaduras existen múltiples sitios de unión de la DNA polimerasa ϵ (Tsubota et al., 2003), pero además de su asociación estable a DNA de cadena sencilla (ssDNA), también presenta una fuerte afinidad de unión a DNA de cadena doble (dsDNA), una característica no presente en el resto de DNA polimerasas (Tsubota et al., 2003). Se sabe que el dominio N-terminal de POL2 sólo se une a ssDNA y que por lo tanto la actividad de unión a dsDNA debe residir en el dominio C-terminal o en las subunidades auxiliares del complejo (Tsubota et al., 2006). Así, la sobreexpresión simultánea de *DPB3* y *DPB4* forma un heterodímero estable que se asocia a dsDNA (Tsubota et al., 2006). Sin embargo, la afinidad de este heterodímero por dsDNA es extremadamente débil y solamente cuando los dos subconjuntos POL2/DPB2 y DPB3/DPB4 se combinan, se establece una asociación estable a dsDNA, existiendo una correlación directa entre la actividad de asociación de este dímero a dsDNA y el grado de silenciamiento transcripcional de las regiones teloméricas (Tsubota et al., 2006). En este sentido, aunque se ha comprobado que *DPB3* y *DPB4* pueden funcionar conjuntamente en procesos de remodelación de cromatina en ausencia del complejo formado por POL2 y DPB2 (Dua et al. 2000), no está claro si esto ocurre así. De hecho, la subunidad *DPB4* es importante para mantener la estabilidad del complejo ϵ , ya que los mutantes en esta subunidad aunque tienen defectos poco severos en la replicación del DNA, cuando se combinan con las mutaciones catalíticas de la subunidad POL2, presentan un fenotipo de letalidad (Ohya et al. 2000). Por otro lado, los mutantes en la subunidad *DPB3* aunque son viables, exhiben una creciente tasa de mutación espontánea, lo que sugiere un importante papel en el mantenimiento de la integridad del DNA (Araki et al. 1991b). Por lo tanto, la DNA polimerasa ϵ en levaduras es capaz de unir DNA de doble banda y de promover silenciamiento epigenético en los telómeros, si bien esta actividad no está asociada con la función polimerasa (Tsubota et al., 2006); una cuestión de interés es si la actividad de unión a dsDNA de la DNA polimerasa ϵ podría participar en mecanismos de silenciamiento transcripcional. El establecimiento del silenciamiento transcripcional y la deposición de histonas en levaduras parecen ser independientes de la replicación del DNA (Kirchmaier y Rine, 2001; Li et al., 2001; Green et al., 2005). Tanto en levaduras como en *Drosophila* se ha demostrado la existencia de una interacción dinámica entre el DNA, *DPB3*, *DPB4* y los componentes del factor remodelador de la cromatina ISW2/CHRC (Iida y Araki, 2004; Hartlepp et al., 2005), facilitando de esta manera el deslizamiento eficiente de los nucleosomas a lo largo del DNA. Así se ha propuesto

que el dímero formado por DPB3 y DPB4 actuaría de forma similar a una chaperona durante la síntesis de DNA, en la que se utilizaría como molde la cromatina, ayudando así a mantener los estados epigenéticos contenidos en la misma (Tsubota et al., 2006).

45. *ESD7* está implicado en el control de la transición floral.

Tanto los análisis de la expresión de *ESD7/AtPOL2a* en el mutante (figura 21), como las predicciones de estructura de la proteína mutada (figura 29 y 30), han revelado que probablemente *esd7-1* sea un alelo hipomórfico, ya que en el mutante no se observa una variación significativa en el patrón de expresión de *ESD7* (figura 21), y el cambio conformacional que teóricamente provoca la mutación *esd7* en la proteína (figura 30), podría causar una disminución de la actividad de alguna de las funciones bioquímicas desempeñadas por la misma, revelando una nueva función para *ESD7* en el control de la floración de *Arabidopsis*. Nuestras observaciones y las de otros grupos (Tzafrir et al, 2004; Jenik et al. 2005; Ronceret et al., 2005) indican que la pérdida total de función de alelos de T-DNA aislados para *ESD7/AtPOL2a* provoca un fenotipo de letalidad embrionaria (figura 7B), lo que está de acuerdo con que los mutantes *esd7-1* y *til1-4*, que también presenta un fenotipo de floración temprana (figura 11), no sean alelos nulos y codifiquen una proteína que mantenga cierta actividad. Asimismo, hemos comprobado que la función del gen homólogo a *ESD7/AtPOL2a*, denominado *AtPOL2b*, es redundante a la desempeñada por *ESD7* en el control del tiempo de floración (figura 12), lo que apoyaría nuestra hipótesis acerca del papel que desempeñan las subunidades catalíticas de la DNA polimerasa ϵ en el control de la transición floral.

Por otro lado, la función de *ESD7* y de *AtPOL2b* también es necesaria en el control del desarrollo embrionario durante las fases embrionarias iniciales del esporofito diploide (Ronceret et al., 2005), lo que sugiere la participación de las subunidades catalíticas de la DNA polimerasa ϵ en el control de diferentes fases del desarrollo. En este sentido, hemos comprobado que durante el desarrollo vegetativo, el papel represor de *ESD7* sería necesario principalmente durante la fase vegetativa adulta (figura 13), al igual que ocurre con otras mutaciones en genes represores tales como *EBS* y *ESD4*, o en mutantes que afectan a componentes del complejo *AtSWR1* (Gómez-Mena et al., 2001; Reeves et al., 2002; Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008) y de forma opuesta a lo observado en el mutante tardío *ft-1*, que desarrolla una mayor cantidad de hojas maduras en su roseta (Telfer et al., 1997). Los análisis genéticos y moleculares realizados con el mutante *esd7* a lo largo del presente trabajo (figura 32-38, 40-48) nos han permitido hipotetizar acerca del papel represor desempeñado por *ESD7* en esta etapa del desarrollo, momento en el cual el meristemo apical adquiere la suficiente competencia para responder a los estímulos endógenos y ambientales que la planta percibe (revisado en Battey y Tooke, 2002). El triple mutante *ft-1 soc1-1 esd7-1* presenta un fenotipo de floración tardío, idéntico al del doble mutante *ft-1 soc1-1* (figura 38); además, en el mutante *esd7-1* se observa una mayor expresión y una variación en el patrón de expresión de

los genes *FT* y *SOC1*. Estas observaciones nos permiten concluir que *ESD7* sería necesario para reprimir la expresión de estos genes integradores de las rutas de control del inicio de la floración, y postular un modelo en el cual la expresión de ambos integradores florales estaría reprimida por la actividad de la proteína *ESD7* (figura 62). Cabría destacar en este sentido la interacción genética observada entre *ESD7* y *EBS* en el control del tiempo de floración (figura 49), ya que ambos loci podrían regular de forma coordinada la expresión de *FT*, aunque no podemos descartar que ambos posean actividades independientes implicadas en el control del desarrollo de los meristemas. Por otro lado, los análisis transcriptómicos y moleculares realizados en el mutante *esd7-1* no muestran una variación significativa de los niveles de expresión de genes que actúan aguas arriba de los integradores florales, como *CO* y *FLC* (figura 58); tampoco se ha observado interacción genética alguna entre el locus *ESD7* y los genes representativos de las rutas del fotoperíodo, autónoma y de la ruta de las GAs analizados, lo que en conjunto sugiere que *ESD7* regula la expresión de los integradores florales de manera independiente de las distintas rutas que participan en el control del tiempo de floración (figuras 32-34).

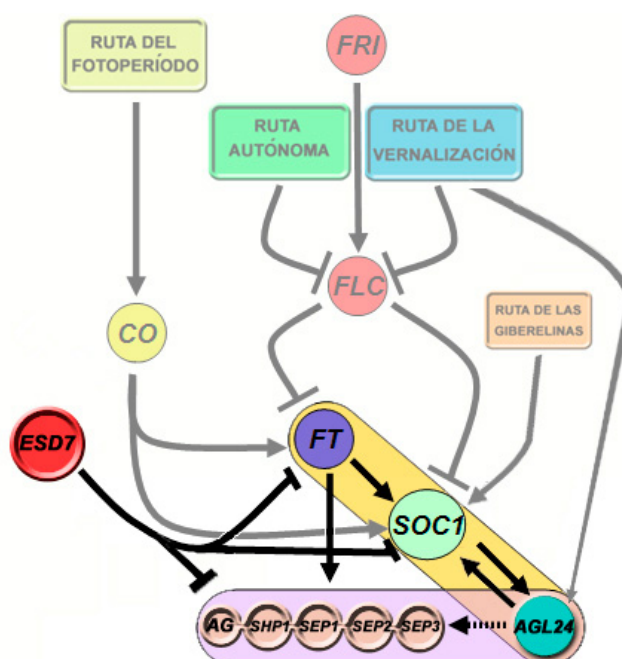


Figura 62: Modelo hipotético del papel que ejerce *ESD7* en el control del tiempo de floración. Los análisis transcriptómicos y de expresión llevados a cabo en este trabajo indican que *ESD7* reprime transcripcionalmente la expresión de los genes integradores de la floración *FT*, *SOC1* y *AGL24* y de los genes de identidad de meristemo floral *AG*, *SHP1*, *SEP1-3*.

Asimismo, mediante los análisis transcriptómicos y de RT-PCR llevados a cabo, hemos comprobado a nivel molecular que *ESD7* también reprime la expresión del integrador floral *AGL24* (figura 59), que como se ha comentado con anterioridad, participa conjuntamente con *SOC1* en la activación de *LFY* (Lee et al., 2008). Además, de forma similar a como ocurre con otros represores implicados en mecanismos de remodelación de la cromatina tales como *CLF*,

FIE, *TFL2* y *EBS* (Goodrich et al., 1997; Kinoshita et al., 2001; Kotake et al., 2003; Piñeiro et al., 2003; Katz et al., 2004), hemos comprobado que *ESD7* también ejerce un papel represor sobre genes implicados en la especificación de la identidad de meristemo floral tales como *AG*, *SHP1*, *SEP1*, *SEP2* y *SEP3* (figura 59), lo que nos ha llevado a proponer un modelo hipotético sobre la función que *ESD7* puede ejercer en la represión floral (figura 62). Los genes *SEP* actúan, en combinación con los genes *A*, *B* y *C*, en la especificación de sépalos, pétalos, estambres y carpelos (Castillejo et al., 2005), de tal forma que la presencia de proteínas *SEP* es necesaria para activar tanto a *AG* como a genes homeóticos que actúan aguas abajo de *AG*. De hecho, la expresión constitutiva de *SEP3* provoca un fenotipo de floración temprano, resultado de la activación de la expresión de un grupo de genes de identidad de órgano floral y de la activación ectópica de *AP3* y *AG* (Castillejo et al., 2005). Por lo tanto, el aumento de expresión de genes *SEP* observado en el mutante *esd7-1* podría contribuir también a su fenotipo de floración temprana.

46. *ESD7* regula la expresión de genes de identidad de meristemo apical y de tipo celular en el meristemo radicular.

En este trabajo hemos aportado evidencias de que la actividad de *ESD7* es crítica para la organización del SAM y del RAM. Disponemos de resultados preliminares que indican que el SAM del mutante *esd7-1*, presenta una disposición alterada, no existiendo una separación clara entre las capas L2 y L3 del mismo. Además, los datos obtenidos tanto en los análisis transcriptómicos como con plantas transgénicas portadoras de construcciones deladoras fusionadas a las secuencias promotoras de los genes *STM* y *CLV3* (figura 20) indican que en el mutante *esd7-1* existe una mayor expresión del gen de identidad de meristemo *STM* ($p\text{-value}=0,05$; $\text{fold change}=1,6$; datos transcriptómicos no mostrados), sin que se haya observado una variación en el nivel de expresión de *CLV3*. El cambio de expresión detectado para *STM* en el análisis transcriptómico es moderado, lo que podría deberse a que la expresión de este gen muestra un patrón restringido a determinadas células de una zona específica del meristemo apical que supone una fracción mínima del tejido empleado para el análisis. Por lo tanto, *ESD7* sería necesario no sólo para reprimir la expresión de genes homeóticos florales como *AG*, sino también de genes homeóticos de identidad de meristemo apical como *STM*. En este sentido, los datos aportados por otros grupos de investigación indican que la represión transcripcional de los genes homeóticos *AG* y *STM* está determinada en parte, por componentes de complejos remodeladores de la cromatina del grupo PcG, tales como *CLF* y *FIE*, correlacionándose las expresiones ectópicas de *AG*, *STM* y de determinados genes tipo *KNAT* con el fenotipo de hoja observado en los mutantes *fie* y *clf* (Goodrich et al., 1997; Katz et al., 2004), que aún mostrando un fenotipo de hoja más dramático que el observado en el mutante *esd7-1*, presentan cierta similitud con éste respecto a su menor tamaño y forma de la hoja. Por lo tanto, el fenotipo de hoja presente en el mutante *esd7-1*, asociado al mayor tamaño

celular observado en las células epidérmicas de las hojas (figura 15B), podría correlacionarse, en parte, con el aumento de la expresión de *STM* y *AG* observado (Clark et al. 1996; Brand et al. 2002; Gallois et al. 2002; Lenhard et al. 2002).

Por otro lado, hemos demostrado que en el mutante *esd7-1* existe un alto grado de desorganización del meristemo radicular (figura 18), lo que está de acuerdo con las observaciones realizadas previamente con el alelo *til1-4* (Jenik et al., 2005), cuyo embrión presenta células de mayor tamaño y división anormal de las células de la hipófisis. Así, las células lenticulares de la hipófisis de *til1-4*, cuya progenie (LCD) formará el centro quiescente de la raíz (QC), presentan una forma y/o disposición anormal, generando un desarrollo asimétrico de las células provasculares y de la endodermis que en última instancia genera un polo de la raíz anormal, desplazando a las células LCD y a las células derivadas de las células basales (BCD), que a su vez formarán la columela de la raíz post-embionaria (Jenik et al., 2005). Además, la desorganización del meristemo radicular de *esd7-1* es similar a la que presentan una serie de mutaciones que afectan a factores estabilizadores de la cromatina tales como *FAS1* y *FAS2* (Kaya et al., 2001), *MRE11* (Bundock y Hooykaas, 2002), componentes del complejo STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES (SMC2), o BRU1/MGO3/TSK y TEB (Guyomarc'h et al. 2004; Suzuki et al., 2004; Takeda et al., 2004; Inagaki et al., 2006). Hemos comprobado que, al igual que en estos mutantes, el patrón de expresión de *SCR* está alterado en el mutante *esd7-1* (figura 19); el análisis transcriptómico ha revelado que *SCR* tiene un menor nivel de expresión en *esd7-1* ($p\text{-value}=0,05$; $fold\ change=0,7$) que en la planta silvestre, mientras que los datos obtenidos con el mutante *esd7-1* portando la construcción *SCR::GFP* indican la existencia de una expresión ectópica de *GFP* en ciertas agrupaciones de células (figura 19), observándose también una expresión discontinua en las células que rodean al centro quiescente del meristemo radicular. De forma similar a *esd7-1*, en los mutantes *fas1* también existe una expresión ectópica de *GFP* en células aisladas o en agrupaciones de células adyacentes a las células que normalmente expresan el gen delator (Kaya et al., 2001), aunque la señal de *GFP* está mucho más distorsionada que en *esd7-1*. También en fondo genético *teb-1*, el delator *GFP* se expresa de una forma similar a la observada en *esd7-1*, localizándose en algunas células de la endodermis de la raíz y presentando un patrón de expresión discontinuo a lo largo de todo este tejido (Inagaki et al., 2006), y que a diferencia de lo observado para los mutantes *tsk* y *fas* (Kaya et al., 2001; Suzuki et al., 2004), no presenta una expresión ectópica del delator (Inagaki et al., 2006). Todas estas observaciones sugieren que determinados factores estabilizadores de la cromatina, implicados en mecanismos de replicación, reparación del DNA y remodelación de la cromatina, mantienen el estado de expresión de genes reguladores que determinan la identidad del meristemo apical y el patrón radial de la raíz; sin embargo, en muchos casos se desconoce como estos factores, en concreto los implicados en mecanismos de replicación, intervienen en los mecanismos de silenciamiento transcripcional.

47. ESD7 podría estar implicado en mecanismos de reparación del DNA en *Arabidopsis*.

Como se ha comentado anteriormente, la DNA polimerasa ϵ también ha sido implicada en procesos de reparación del DNA (Alexander et al, 2002; Nyberg et al 2002; Pursell et al., 2007a; Pursell y Kunkel 2008); de hecho, el enzima fue originalmente purificado de células humanas HeLa como un factor requerido para la reparación de daños del DNA causados por luz UV (Nishida et al. 1988). Estudios genéticos en levaduras también apoyan este hecho y se ha demostrado *in vivo* que tanto la DNA polimerasa ϵ como la δ pueden catalizar la síntesis de DNA inducida por luz UV (Budd y Campbell 1995; Halas et al. 1999). De esta forma, se ha comprobado que la DNA polimerasa ϵ actúa en la reparación por escisión de nucleótido (NER), que repara el daño que afecta a cadenas de 2 a 30 nucleótidos, incluyendo los daños que deforman la hélice de DNA, como ocurre con la dimerización de la timina causada por luz UV (Aboussekhra et al. 1995; Shivji et al. 1995); también se ha comprobado que la DNA polimerasa ϵ parece ser la que más específicamente interviene en este proceso, aunque la DNA polimerasa δ puede también realizar una síntesis similar en procesos de reparación (Aboussekhra et al. 1995). La DNA polimerasa ϵ tiene además otro papel en la reparación por escisión de bases (BER), mecanismo que repara el daño sobre un sólo nucleótido causado por oxidación, alquilación, hidrólisis o desaminación (Friedberg et al., 1995; Stucki et al., 1998; Parlanti et al., 2007). Esto lo sugiere el hecho de que los mutantes de levaduras que no pueden reparar estos daños, pueden recuperar esta actividad de reparación por la adición de DNA polimerasa ϵ purificada, aunque también las DNA polimerasa α y δ influyen indirectamente la síntesis en la reparación (Wang et al. 1993). Además, para que la BER tenga lugar y que tanto la DNA polimerasa ϵ como δ lleven a cabo eficientemente esta actividad reparadora, se requieren factores de replicación tales como PCNA y RFC (Stucki et al. 1998, Pascucci et al. 1999). En mamíferos, la DNA polimerasa ϵ también se ha encontrado asociada a un complejo proteico implicado en recombinación, que participa en la reparación de roturas de doble cadena de DNA (DSB) y de deleciones (Holmes y Haber, 1999; Jessberger et al., 1993). Así por ejemplo, la DNA polimerasa ϵ en humanos forma parte del complejo de la RNA polimerasa II, que además de poseer los factores básicos de la transcripción del DNA, contiene factores de replicación tales como REPLICATION PROTEIN A (RPA), RFC y DNAPK, una proteína quinasa necesaria para la reparación de roturas de doble cadena y la recombinación (Maldonado et al. 1996).

La DNA polimerasa ϵ corrige errores en el DNA gracias a la actividad exonucleasa de la subunidad catalítica, ya que levaduras mutantes en este dominio provocan un fenotipo mutador (Morrison y Sugino 1994). Sin embargo, el dominio C-terminal tipo dedo de zinc también parece ser importante en este proceso de reparación, ya que son varios los mutantes puntuales en

este dominio o en zonas adyacentes al mismo, que presentan fenotipos defectivos en crecimiento en respuesta a agentes genotóxicos (Budd y Campbell 1993; Navas et al. 1995, 1996; Dua et al. 1998). Se ha sugerido que el dominio C-terminal coordina la transcripción en la fase S del ciclo celular en respuesta a los daños o a los fallos en replicación del DNA, ya que el mutante *pol2* de levaduras fue aislado en un rastreo para detectar mutantes defectuosos en la activación transcripcional del gen *RNR3*, inducible por daños en el DNA (Navas et al. 1995, 1996). *pol2* también es defectivo en la entrada a mitosis, algo característico de mutantes del punto de control G1 para entrar en la fase S del ciclo celular. Por lo tanto, es probable que estas mutaciones causen un cambio conformacional de la proteína que disminuya la función de los dominios exonucleasa situados en la parte N-terminal y/o modifiquen la interacción con los otros componentes del complejo que también estén implicados en este proceso.

La predicción de estructura secundaria de ESD7/POL2a indica que la mutación *esd7* podría provocar un cambio conformacional que afectase al dominio responsable de la función exonucleasa correctora de errores (figura 29). Asimismo, hemos observado que existe una regulación positiva de la expresión de *ESD7* por exposición a drogas que generan estrés genotóxico (figura 24) y hemos demostrado que el mutante *esd7-1* es más sensible a MMC que la planta silvestre, pero no a BLE (figura 25). Observaciones similares se han realizado en mutaciones de genes implicados en HR, tales como *AtBARD1*, *AtBRCA1*, ó mutaciones en los parálogos de *RAD51*: *AtRAD51B*, *AtRAD51C* y *AtXRCC3*, las cuales provocan una mayor sensibilidad a la MMC, pero no a la BLE o a la radiación γ (Bleuyard y White, 2004; Abe et al, 2005b; Osakabe et al, 2005; Reidt et al, 2006). Estos datos podrían sugerir que la DNA polimerasa ϵ de *Arabidopsis* probablemente esté implicada en mecanismos de reparación del DNA por HR. Por otro lado, mutaciones en genes tales como *TEBICHI* (Inagaki et al., 2006), *BRU1* (Takeda et al., 2004) y *FAS* (Takeda et al., 2004; Ramírez-Parra y Gutiérrez, 2007a), presentan mayor susceptibilidad que las plantas silvestres tanto a MMC como a BLE o MMS, lo que podría indicar que estos genes no sólo estarían implicados en mecanismos de reparación del DNA por HR, sino que podrían jugar un papel más general en los mecanismos de reparación de DNA por DSR, como ocurre por ejemplo con *FAS* (Endo et al., 2006; Kirik et al., 2006).

Disponemos de evidencias experimentales preliminares que indican que el mutante *esd7-1* es más sensible que la planta silvestre a tratamientos con luz UV-C, lo que reforzaría el posible papel que ESD7 desempeña en procesos de reparación de DNA. En paralelo, hemos comprobado que al igual que ocurre con las mutaciones en los loci *FAS* (Schönrock et al., 2006; Ramírez-Parra y Gutiérrez, 2007a), o con exposiciones a BLE y a radiaciones ionizantes γ (NASCARRAYS-67, West et al., 2004; Culligan et al., 2006), el mutante *esd7-1* presenta un aumento de expresión de genes implicados en mecanismos de reparación por HR, tales como *RAD51*, *BRCA2* y *GR1*, mientras que no hemos observado una variación de los niveles de expresión de genes implicados en mecanismos de reparación de DSB por NHEJ tales como

AtKU70 y *AtKU80* (figura 26 y 56) (Tamura et al., 2002; West et al., 2002), lo cual apoyaría nuestra hipótesis acerca del papel de *ESD7* en los mecanismos de reparación del DNA por HR. Los datos del análisis transcriptómico realizado con *esd7-1* también están de acuerdo con dicha hipótesis ya que entre los genes sobreexpresados en el mutante se encuentran cuatro genes implicados en mecanismos de reparación del DNA y/o de respuesta a radiaciones ionizantes tales como *ATBRCA1*, *APP*, *TSO2* y *XRI1* (Doucet-Chabeaud et al., 2001; West et al. 2004; Reidt et al., 2006; Wang y Liu, 2006; Dean et al., 2009; figura 56).

Como se ha comentado, la DNA polimerasa ϵ tiene una función poco clara tanto en el control del ciclo celular como en la replicación del DNA, ya que diferentes observaciones realizadas en levaduras han puesto de manifiesto que su actividad polimerasa no es necesaria para la replicación del DNA, mientras que la actividad de su dominio C-terminal si lo es en el control del paso de G1/S del ciclo celular y en última instancia para la viabilidad celular (Navas et al., 1995; Araki, et al., 1995; Dua et al., 1999; Kesti et al., 1999; Wang et al., 1999; Feng y D'Urso, 2001). Tanto en levaduras como en humanos se ha podido demostrar que algunas de las subunidades de la DNA polimerasa ϵ están reguladas transcripcionalmente durante la transición G1/S. Así por ejemplo en humanos, el gen *POLE2* está regulado por dos complejos de proteínas E2F (Huang et al., 2001). En *Arabidopsis* se ha demostrado que *AtPOL2a* y *AtDPB2* están regulados también por proteínas E2F y se transcriben activamente durante la fase S del ciclo celular, mostrando un pico de expresión en la transición G1/S (Ronceret et al., 2005). Por otro lado, se ha descrito que la quinasa dependiente de ciclina, Clb/Cdk (Cdc28 CDK) de levaduras fosforila a la subunidad DPB2, lo cual podría facilitar la actividad polimerasa en la transición G1/S del ciclo celular (Kesti et al., 2004; Liu et al 2006). Asimismo, se ha comprobado que POL2 interacciona con MEDIATOR OF REPLICATION CHECKPOINT 1 (MRC1), una proteína adaptadora requerida para la activación del punto de control G1/S en respuesta al arresto de la horquilla de replicación (Lou et al., 2008). Sin embargo, se desconoce si estas u otras interacciones tienen lugar en plantas y si la actividad del complejo de la DNA polimerasa ϵ está regulada en varios puntos de control a lo largo del ciclo celular, si bien se ha podido detectar un aumento de transcripción significativo de *AtPOL2a* en la transición G2/M, que podría estar relacionado con una actividad de reparación del DNA antes de la entrada en mitosis (Ronceret et al., 2005).

Tanto en levaduras como en mamíferos, las ciclinas mitóticas y las quinasas dependientes de ciclina son necesarias para la activación de los puntos de control del ciclo celular en respuesta a daños en el DNA y también para la reparación por HR (Rasmussen et al., 2000; Caspari et al., 2002; Grandin et al., 2003; Ira et al., 2004). Así por ejemplo, la cdk/ciclina B1 de mamíferos y la Clb2-Cdk1 de levaduras fosforilan a las subunidades del complejo CAF-1, p60 y CAC1, respectivamente, para que la célula pueda progresar a través de la fase G2 del ciclo celular (Keller et al., 2000; Ubersax et al., 2003). Por lo tanto, en la transición G2/M se garantiza la síntesis correcta y completa del DNA antes de la entrada en mitosis y la citocinesis.

De esta manera son las ciclinas de tipo B las que están involucradas en la transición G2/M en caso de existan daños en el DNA (Stark y Taylor, 2006). Los datos de expresión obtenidos en los análisis transcriptómicos y los ensayos realizados para comprobar la estabilidad de la ciclina CYCB1::1 (figura 27) han revelado que en el mutante *esd7-1* existe una mayor expresión del gen *CYCB1::1* ($p\text{-value}=0,05$; $\text{fold change}=1,5$), y que esta ciclina presenta una mayor estabilidad en las células en proliferación, lo que sugiere que la mutación *esd7* podría inducir la actividad de esta ciclina, ya sea por tener menor actividad de reparación del DNA y/o en respuesta a los daños que se producen en el DNA. Un aumento transcripcional y de actividad de la ciclina CYCB1;1, en ausencia de otros reguladores positivos de las ciclinas de tipo B, también se ha observado en respuesta a la acción bloqueante de la afidicolina sobre otras polimerasas replicativas (Menges et al., 2005), en respuesta a exposición a BLE y MMC (Chen et al., 2003) y en mutantes tales como *fas1*, *fas2*, *atm-1*, *teb-1* y *tsk-1* (Culligan et al., 2006; Inagaki et al., 2006; Schönrock et al., 2006; Ramírez-Parra y Gutiérrez, 2007a). Por lo tanto, es posible que en *Arabidopsis* la CYCB1::1 no sólo funcione durante la mitosis, sino que también modifique su función en respuesta a la menor actividad de ESD7 y del complejo CAF-1 o en respuesta a estreses en la replicación, y que el aumento transcripcional observado en G2 para *ESD7* (Ronceret et al., 2005) sea el resultado de una regulación transcripcional en respuesta a daños en el DNA. Si bien la transcripción de *CYCB1::1* se sincroniza normalmente con la de otros miembros de la familia de Ciclinas B en el ciclo celular, la CYCB1;1 podría ser la única que desempeñe un papel en respuesta a los daños que se ocasionan en el DNA. Estos datos sugieren que ciertos factores implicados en mecanismos de reparación del DNA y en procesos de remodelación de la cromatina convergen en el punto de control G2 del ciclo celular.

48. ESD7 interacciona física y genéticamente con TFL2/LHP1 en *Arabidopsis*.

En levaduras, existen varias evidencias que indican que el silenciamiento transcripcional está relacionado con factores implicados en mecanismos de replicación del DNA (McNairn y Gilbert, 2003; Vermaak et al., 2003; Craig, 2004). Mutaciones que afectan a componentes del ORIGIN RECOGNITION COMPLEX (ORC; Micklem et al., 1993; Bell et al., 1995; Fox et al., 1995), o a factores tales como PCNA, RFC o las DNA polimerasas α y ϵ , afectan al silenciamiento de genes heterocromáticos (Ehrenhofer-Murray et al., 1999; Smith et al., 1999; Zhang et al., 2000). Así, en *Schizosaccharomyces pombe* se ha propuesto un mecanismo conservado evolutivamente, donde el papel de la DNA Pol α (SWI7) en silenciamiento transcripcional está mediado por la interacción con SWI6, una proteína homóloga a la proteína HP1 de *Drosophila* (Ahmed et al., 2001; Nakayama et al., 2001). Sin embargo, la función molecular principal que desempeña la subunidad catalítica de la DNA polimerasa α es la de sintetizar un cebador para cada origen de replicación, tanto en la hebra de síntesis directa como en la hebra de síntesis indirecta, aunque también ha sido implicada en el control de la progresión del ciclo celular en las respuestas a daños en el DNA al igual que POL2 (revisado

por García-Díaz y Bebenek, 2007). Asimismo, en *Arabidopsis* el gen *ICU2* se ha implicado en mecanismos de silenciamiento génico y de memoria celular (Barrero et al., 2007). *ICU2* codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa α y al igual que *ESD7*, está implicado en mecanismos de represión transcripcional de los integradores florales *FT* y *SOC1*, así como de los genes de identidad de meristemo floral *AG*, *AP1*, *AP3*, *PISTILLATA (PI)*, *SEP3*, *CAULIFLOWER (CAL)* y *FULFRUIT (FUL)*; se ha propuesto que dicha represión transcripcional podría estar mediada por la interacción existente entre la polimerasa α y la proteína TFL2/LHP1, de forma análoga a la descrita en levaduras de fisión (Barrero et al. 2007).

Nosotros hemos demostrado que *ESD7* interacciona *in vitro* con TFL2/LHP1, probablemente a través de alguno de los dominios MIR localizados en la primera mitad del extremo C-terminal de la proteína (figuras 47 y 48), lo que sugiere que el extremo C-terminal de la DNA polimerasa ϵ podría participar en el mantenimiento de la represión transcripcional y más concretamente en los mecanismos de represión de la transición floral mediados por LHP1/TFL2. Hasta este momento no se ha reportado interacción molecular alguna entre un ortólogo de HP1 y la subunidad catalítica de la DNA polimerasa ϵ , siendo ésta la primera demostración. Por otro lado, aunque se desconoce la estructura del extremo C-terminal de *ESD7* en el alelo *esd7-1*, la predicción de estructura terciaria de la proteína (figura 30) sugiere la existencia de un cambio conformacional que afectaría a gran parte de la proteína y que podría modificar la accesibilidad del dominio MIR, lo cual podría disminuir la capacidad de interacción con LHP1/TFL2. Asimismo, la interacción genética existente entre *ESD7* y los loci *TFL2* e *ICU2* (figuras 45 y 51, respectivamente) permite proponer un modelo análogo al descrito por Barrero y colaboradores (Barrero et al., 2007), donde tanto *ICU2* como *ESD7* participarían en la herencia epigenética, facilitando la interacción de LHP1/TFL2 con H3K27me3 en cada ronda de replicación celular. Por lo tanto, LHP1 podría funcionar como un adaptador que reúna a diferentes proteínas en complejos multiproteicos a través de interacciones proteína-proteína y en *Arabidopsis* parece interaccionar con *ESD7* de forma similar a la demostrada con otras proteínas de eucariotas (Ahmed et al., 2001; Nakayama et al., 2001; Barrero et al. 2007).

49. ESD7 necesita la actividad de FAS2 para ejercer su función en la represión de la transición floral.

El papel que desempeñan los factores implicados en mecanismos de replicación del DNA en el mantenimiento del silenciamiento génico no está claro y parece ser independiente de su función en la replicación (Fox et al., 1997; Kirchmaier y Rine, de 2001; Li et al., 2001, Tsubota et al., 2006), por lo que sus actividades deben estar acopladas a factores que establezcan y mantengan el silenciamiento transcripcional en un momento concreto del ciclo celular. Se ha comprobado que tanto en levaduras como en metazoos, existe una relación directa entre la replicación del DNA y el ensamblaje de la cromatina, ya que la señalización mediada por PCNA

en las moléculas de DNA recién replicado promueve el ensamblaje del complejo de histonas H3-H4 a través del complejo CAF-1 (Smith y Stillman 1989; Shibahara y Stillman, 1999; Nakatani et al., 2006; Polo y Almouzni 2006; Takami et al., 2007). En ambos casos, el complejo CAF-1 se ha implicado tanto en represión transcripcional de genes heterocromáticos, como en la formación y mantenimiento de la heterocromatina al final de la fase S del ciclo celular, sugiriéndose que ambas actividades están mediadas por la interacción existente entre los homólogos de la subunidad mayor de este complejo CAF-1 y de HP1 (Murzina et al, 1999; Quivy et al., 2004; Dohke et al., 2008). De esta manera se ha propuesto en mamíferos un modelo semiconservativo para la duplicación de nucleosomas que permitiría la separación de los dímeros parentales H3-H4, y que a su vez mantendría la información epigenética destinada a cada cromátida hija (Nakatani et al., 2006). Sin embargo, aunque en *Arabidopsis* se ha comprobado que el complejo CAF-1 es necesario para la formación de la heterocromatina, no se requiere para el mantenimiento del silenciamiento transcripcional de genes heterocromáticos, ya que la mayor parte de estos continúan reprimidos en los mutantes de este complejo (Schönrock et al., 2006). Además, la mayoría de los genes eucromáticos no presentan una gran variación de expresión en los mutantes *fas1* y *fas2*, aumentando sólo la expresión de ciertos genes que se transcriben al final de la fase S del ciclo celular, como algunos genes implicados en mecanismos de reparación del DNA (Schönrock et al., 2006; Ramírez-Parra y Gutiérrez, 2007a). Por otro lado, los datos aportados por Hennig y colaboradores corroborarían estas observaciones, ya que la expresión de genes como *AG* o *AP2* no varía ni en los mutantes *fas1* y *fas2*, ni en el doble mutante *fas1 fas2*, con respecto a la planta silvestre (Hennig et al. 2003). Por su parte, nuestros resultados indican que tanto en el mutante *fas2-1* como en el doble mutante *esd7-1 fas2-1* no existe una variación significativa en la expresión de los integradores florales *FT*, *SOC1* y *AGL24*, o de los genes de identidad de meristemo floral *AG*, *SHP1* y *SEP1-3* (figuras 55 y 60), lo que indica que la función de *FAS2* sería necesaria para que *ESD7* realice su función represora en el control del tiempo de floración. Por otro lado, el hecho de que los mutantes *fas2-1* y *esd7-1 fas2-1* presenten un fenotipo de floración tardío (figura 54) y que *fas2-1* suprima el fenotipo temprano de *esd7-1*, podría ser atribuido a que la falta de función de *FAS2* provoque un silenciamiento estable y prolongado de genes activadores de la floración, si bien en el momento en el que hemos ensayado su expresión (7 días DL; 14 días DC), no hemos detectado variación en la expresión de los genes analizados con respecto al silvestre (figura 55).

Evidencias recientes en *Schizosaccharomyces pombe* indican que la pérdida de funciones del complejo CAF1 provoca un efecto estable y pronunciado en el silenciamiento transcripcional de la heterocromatina (Dohke et al., 2008), ya que durante el punto de control G1/S del ciclo celular, SWI6 (HP1) parece asociarse con CAF1, disociándose de la heterocromatina y permitiendo la transcripción de genes que permanecen silenciados en los mutantes de pérdida de función del complejo CAF1. Durante la fase S del ciclo celular, SWI6-CAF se distribuye tanto en la eucromatina como en la heterocromatina, si bien termina

localizándose en la heterocromatina, por lo que se ha propuesto que CAF-1 distribuiría a SWI6 conforme van avanzando las horquillas de replicación a lo largo del ciclo celular, proveyendo en las marcas establecidas (H3K9me3/H3K27me3) al factor que mantendrá el silenciamiento epigenético apropiado en cada fase del ciclo celular (Dohke et al., 2008). La evidencia de que el complejo CAF1 interacciona con SWI6 (HP1) en levaduras (Dohke et al., 2008), podría ayudar a establecer una posible conexión entre el hecho de que TFL2/LHP1 interaccione con ESD7 en *Arabidopsis*, y que *ESD7* requiera la actividad FAS2 para ejercer su función en la represión transcripcional de diferentes genes.

50. ESD7 podría regular el reclutamiento de factores que modifican la acetilación y metilación de la histona H3 de diferentes regiones del genoma de *Arabidopsis*.

En este trabajo hemos comprobado que regiones discretas de la cromatina de los loci *FT* y *AG* en el mutante *esd7-1* poseen mayores niveles de acetilación y de metilación de la histona H3 (acetil-H3K9/K14 y trimetil-H3K4) que las plantas silvestres, por lo que las variaciones de expresión observadas para ambos genes en el mutante *esd7-1* (figura 59) podrían atribuirse, al menos en parte, a los patrones de acetilación y metilación observados (figura 61). Estas marcas epigenéticas se han asociado a estados transcripcionalmente activos de la cromatina (He et al., 2003; Ausín et al., 2004; He et al., 2004; Kim et al., 2005b; Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008), por lo que se podría hipotetizar que *ESD7* podría regular el reclutamiento de factores que desacetilan o desmetilan la histona H3 de ciertas regiones del genoma. De forma paralela, también se han descrito aumentos significativos en los niveles de acetilación de ciertas regiones de la cromatina del gen *AG* en el mutante *icu2-1*, en comparación con el silvestre (Barrero et al., 2007), lo que está de acuerdo con que ambas polimerasas pudieran actuar de manera concertada en el reclutamiento de complejos con actividad deacetilasa.

Recientemente se ha descrito en *Arabidopsis* REPLICATION PROTEIN A 2 (RPA2), un factor implicado en mecanismos de silenciamiento epigenético (Xia et al., 2006), que ha aportado nuevos datos sobre como componentes implicados en la replicación del DNA, remodelación de la cromatina y reparación del DNA tales como *BRU1* (Takeda et al., 2004), *FAS1* y *FAS2* (Kaya et al., 2001) o *ICU2* (Barrero et al., 2007), podrían actuar en procesos de silenciamiento transcripcional. El gen *RPA2* codifica el homólogo de *Arabidopsis* de la segunda subunidad de RPA de levaduras, (Elmayan et al., 2005; Kapoor et al., 2005a), que participa en procesos de replicación y de reparación del DNA. Los mutantes *rpa2/ror1* (Kapoor et al., 2005a; Xia et al., 2006) presentan, al igual que *esd7-1*, un fenotipo enano, son de floración temprana y son más sensibles al estrés genotóxico que la planta silvestre. Además, los mutantes *ror1* se caracterizan por revertir el estado silenciado de la construcción *PNos::nptII/35S::uidA* presente en plantas transgénicas del mutante *ros1*, mientras que se mantiene el silenciamiento del transgén *RD29A::LUC*, conservándose un nivel elevado de metilación en el mismo. *ROS1* codifica una DNA glicosilasa/liasa que desmetila el DNA (Gong et al., 2002). Curiosamente, la

mutación *ror1* no parece afectar a los niveles de metilación del DNA, ni a ningún siRNA, implicados en silenciamiento génico (Elmayan et al., 2005), sino que afecta a los niveles de metilación de la histona H3. Así, mientras que en las plantas silvestres o *ros1*, el promotor 35S permanece silenciado y contiene niveles altos de la marca represiva H3mK9 dimetilada, los mutantes *rpa2/ror1* contienen, al igual que *esd7-1*, elevados niveles de las marcas epigenéticas activadoras trimetil-H3mK4 y acetil-H3K9/K14 (Kapoor et al., 2005a; Kapoor et al., 2005b), marcas características de la cromatina activa. Además, la pérdida de *RPA2/ROR1* reactiva la transcripción de elementos transponibles heterocromáticos (Athila, AtMu1 y AtLINE1-4), algo que también ocurre en el mutante *esd7-1* con los retrotransposones SADHU4-2 y AtRE1 (figura 56). Por otra parte, ROS1 y RPA2 interactúan físicamente, lo que ha llevado a postular que la demetilación del DNA sea un proceso que actúe junto con la metilación de la histona H3mK9 (Kapoor et al., 2005a); así una vez que se establece el silenciamiento epigenético, la marca en H3mK9 se transmite de una célula a otra en un proceso mediado por RPA2. Sin embargo, la transmisión de las marcas de metilación en el DNA o en la histona H3 podrían ser hechos independientes, ya que muchos eucariotas no utilizan la metilación del DNA como un mecanismo regulador de la transcripción, mientras que la metilación de H3mK9 está ampliamente conservada. Actualmente en nuestro grupo estamos analizando la relación genética existente entre *RPA2/ROR1* y *ESD7*, mediante el estudio del doble mutante *ror1 esd7*, y ensayando la posibilidad de que *esd7* también suprima el silenciamiento del trasgen originado por la mutación *ros1*, al igual que lo hacen otros represores tales como *RPA2/ROR1* Y *TSL* (Wang et al., 2007d), por lo que *ESD7* podría estar implicado en la propagación del silenciamiento de la cromatina de ciertos loci, conjuntamente con *RPA2/ROR1* (Xia et al., 2006).

Por lo tanto, la caracterización genética y molecular del mutante de pérdida parcial de función *esd7-1* realizada en este trabajo, ha permitido revelar varias de las funciones biológicas desempeñadas por el gen *ESD7/POL2a* en las plantas que no habían sido previamente caracterizadas, tales como su papel en el control de la transición floral y de otros procesos de desarrollo de la hoja y de la raíz. Así, la actividad de ESD7 es crítica para la organización del SAM y del RAM, participando en la regulación de la expresión de genes de identidad de meristemo apical y de tipo celular en el meristemo radicular. La mutación *esd7* podría liberar específicamente el silenciamiento transcripcional de algunas regiones genómicas que contienen loci implicados en mecanismos de control del desarrollo e incrementar los mecanismos de reparación del DNA por recombinación homóloga.

A microscopic image of plant tissue, likely a cross-section of a leaf or stem, showing a network of cells with prominent cell walls and nuclei. The tissue is stained, giving it a purple and yellowish appearance. The word "CONCLUSIONES" is overlaid in the center in a black, serif font.

CONCLUSIONES

Microscopía óptica de un corte transversal
del meristemo apical del mutante *esd7-1*

1. El mutante de floración temprana *esd7-1* caracterizado en este trabajo, presenta una mutación puntual en el gen que codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa epsilon (ϵ), AtPOL2A, una proteína necesaria para el desarrollo del embrión e implicada en la fase adulta del desarrollo vegetativo, en el control del tiempo de floración y en el desarrollo de las raíces, hojas, flores y frutos. Asimismo, el gen *AtPOL2b* codifica una proteína homóloga a ESD7 que posee una función redundante a esta en el control del tiempo de floración.

2. *ESD7* se expresa mayoritariamente en zonas meristemáticas y en tejidos jóvenes con una alta tasa de división celular. La mutación *esd7* no afecta a los niveles de expresión de su mensajero, lo que indica que se trata de un alelo hipomórfico.

3. La predicción de estructura secundaria y terciaria de la región N-terminal de la subunidad catalítica ESD7/AtPOL2a indica que la mutación *esd-1* podría provocar un cambio conformacional que afectase a parte de los dominios polimerasa y a los responsables de la función exonucleasa correctora de errores.

4. La estructura del complejo de la DNA polimerasa ϵ de *Arabidopsis* podría ser similar a la descrita en otros organismos eucariotas, ya que hemos demostrado que la subunidad catalítica POL2a interacciona “in vivo” en el núcleo con la subunidad reguladora DPB2.

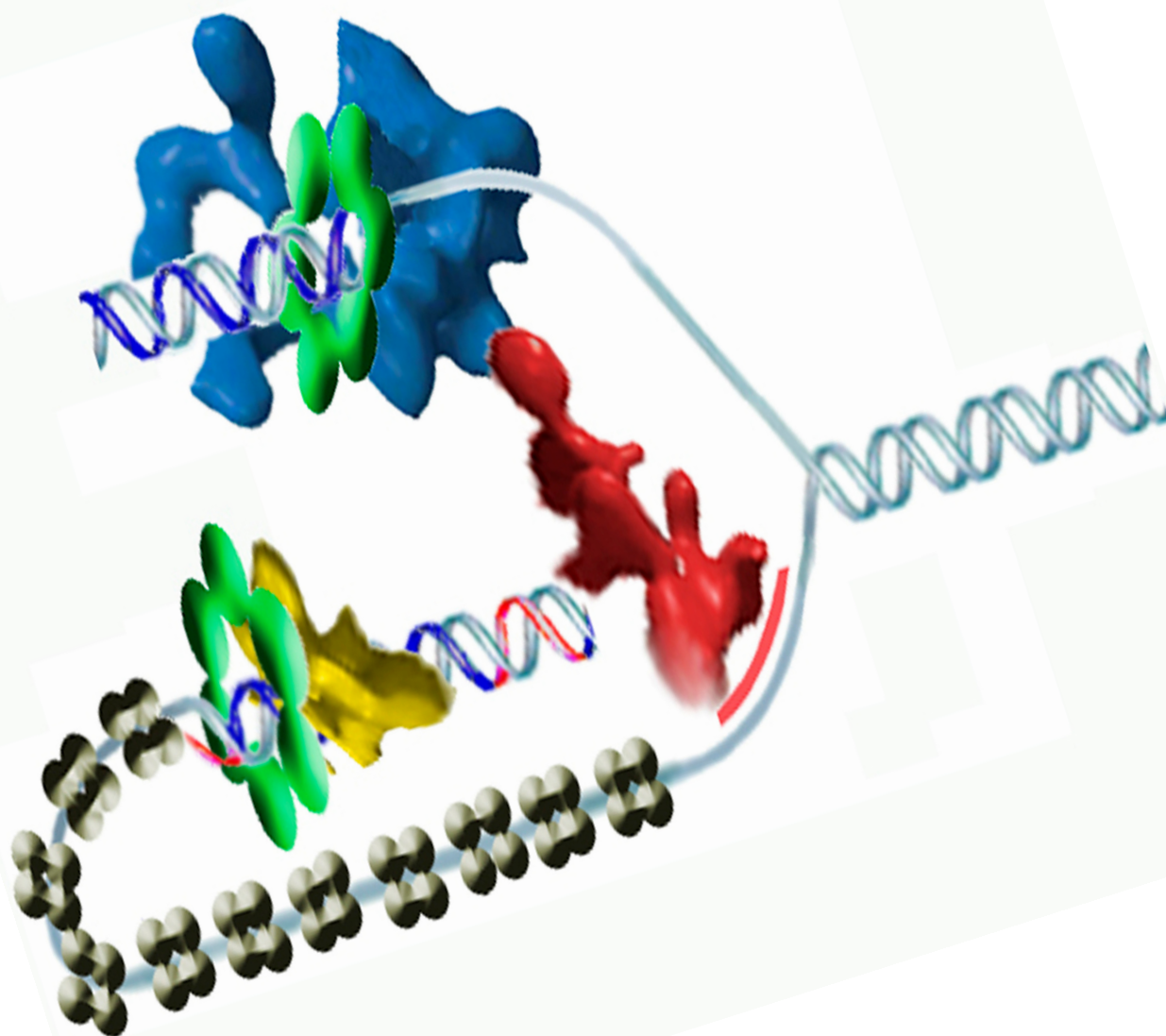
5. La mutación *esd7-1* incrementa los mecanismos de reparación del DNA por recombinación homóloga. Así, la exposición a agentes genotóxicos induce la expresión del mensajero de *ESD7*, y el mutante *esd7-1* presenta mayor susceptibilidad a MMC y a luz UV-C, teniendo afectados los niveles de expresión de genes implicados en mecanismos de reparación del DNA por HR como *RAD51*, *BRCA1*, *BRCA2* y *GR1* y de genes de control del ciclo celular tales como la ciclina *CYCB1;1*.

6. *ESD7* no interacciona genéticamente con la ruta del fotoperiodo, ruta autónoma o ruta de la giberelinas, pero necesita de proteínas FT y SOC1 funcionales para realizar su función en el control del tiempo de floración, regulando específicamente la expresión de ambos integradores florales así como la expresión de AG y de algunos genes homólogos AGL.

7. *ESD7* interacciona con loci que codifican proteínas relacionadas con procesos de remodelación de cromatina tales como el represor transcripcional *TFL2/LHP1*, con el que interacciona sinérgicamente, o con el represor floral *EBS* con el que interacciona de forma epistática, regulando conjuntamente la expresión de *FT* y *SOC1*. Además, el dominio carboxi-terminal de la proteína ESD7 interacciona “in vitro” con la proteína TFL2/LHP1.

8. *ESD7* interacciona con loci implicados en la replicación del DNA como *ICU2* y con loci implicados en el ensamblaje de la cromatina como *FAS2*, con los que interacciona de forma epistática, de tal forma que proteínas *ICU2* y *FAS2* funcionales son necesarias para que *ESD7* regule la expresión de *FT* y *SOC1*, y ejerza su función en la represión de la transición floral.

9. *ESD7* podría regular el reclutamiento de factores que modifican la acetilación y metilación de la histona H3 de diferentes regiones del genoma, ya que en el mutante *esd7-1* existen regiones discretas de la cromatina de los loci *FT* y *AG* enriquecidas en la marcas epigenéticas activadoras tales como Ac-H3 y trimetil-H3K4. La mutación *esd7-1* podría liberar de forma específica el silenciamiento transcripcional de ciertas regiones genómicas portadoras de loci implicados en mecanismos de control del desarrollo.



BIBLIOGRAFÍA

Modelo de una horquilla de replicación eucariota compuesto por las DNA polimerasas α (rojo), ϵ (azul) y δ (amarillo), PCNA (verde) y RPA (gris)

- Aarts, M.G.M., Dirkse, W.G., Stiekema, W.J. and Pereira, A. (1993). Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 363, 715-717.
- Abe M., Kobayashi Y., Yamamoto S., Daimon Y., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Notaguchi M., Goto K. y Araki T. (2005a). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator *FT* at the shoot apex. *Science* 309(5737), 1052-6.
- Abe K., Osakabe K., Nakayama S., Endo M., Tagiri A., Todoriki S., Ichikawa H. y Toki S. (2005b). *Arabidopsis* *RAD51C* gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant Physiol.* 139, 896-908.
- Aboussekhra A., Biggerstaff M., Shivji M.K., Vilpo J.A., Moncollin V., Podust V.N., Protic M., Hübscher U., Egly J.M. y Wood R.D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 80, 859-868.
- McNairn A.J y Gilbert D.M (2003). Epigenomic replication: linking epigenetics to DNA replication. *BioEssays* 25, 647-656.
- Ahmed S., Saini S., Aroras. y Singh J. (2001). Chromodomain Protein Swi6-mediated Role of DNA Polymerase alpha in Establishment of Silencing in Fission Yeast. *J. Biol. Chem.* 276 (51), 47814-47821.
- Ahn J.H., Miller D., Winter V.J., Banfield M.J., Lee J.H., Yoo S.Y., Henz S.R., Brady R.L. y Weigel D. (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*. *EMBO J.* 25, 605-14.
- Alabadí D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon F.G., Más P. y Kay S.A. (2001). Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293, 880-883.
- Alexander J. Osborn, Stephen J. Elledge y Lee Z. (2002). Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *TRENDS in Cell Biology*. Vol.12 No.11
- Alexandre C.M. y Hennig L. (2008). *FLC* or not *FLC*: the other side of vernalization. *J. Exp. Bot.* 59(6), 1127-35.
- Allison L.A. (2000). The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie*, 82, 12.
- An H., Roussot C., Suárez-López P., Corbesier L., Vincent C., Piñeiro M., Hepworth S., Mouradov A., Justin S., Turnbull C. y Coupland G. (2004). *CONSTANS* acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* 131, 3615-3626.
- Araki H., Hamatake R., Johnston L.H. y Sugino A. (1991a). *DPB2*, the gene encoding DNA polymerase II subunit B, is required for chromosome replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 4601-4605.
- Araki H., Hamatake R., Morrison A., Johnson A.L., Johnston L.H. y Sugino A. (1991b). Cloning *DPB3*, the gene encoding the third subunit of DNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 19, 4867-4872.
- Araki H., Ropp, P.A., Johnson A.L., Johnston L.H., Morrison A. y Sugino A. (1992). DNA polymerase II, the probable homolog of mammalian DNA polymerase ϵ , replicates chromosomal DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 11, 733-740.
- Araki H., Leem S.H., Phongdara A. y Sugino A. (1995). *DPB11*, which interacts with DNA polymerase II (epsilon) in *Saccharomyces cerevisiae*, has a dual role in S-phase progression and at a cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11791-11795.
- Araki T. (2001). Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4(1), 63-8.
- Arents G. y Moudrianakis E.N. (1995). The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11170-11174.
- Asturias F.J., Cheung I.K., Sabouri N., Chilkova O., Wepplo D. y Johansson E. (2006). Structure of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon by cryo-electron microscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(1), 35-43.
- Aukerman M.J., Hirschfeld M., Wester L., Weaver M., Clack T., Amasino R.M. y Sharrock R.A. (1997). A deletion in the *PHYD* gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell.* 9(8), 1317-26.
- Aukerman M.J., Lee I., Weigel D. y Amasino R.M. (1999). The *Arabidopsis* flowering-time gene *LUMINIDEPENDENS* is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates *LEAFY* expression. *Plant J.* 18, 195-203.
- Ausín I., Alonso-Blanco C. y Martínez-Zapater J.M. (2005). Environmental regulation of flowering. *Int. J.Dev.Biol.*, 49, 689-705.
- Ayre B.G. y Turgeon R. (2004). Graft transmission of a floral stimulant derived from *CONSTANS*. *Plant Physiol.* 135, 2271-78.

- Balasubramanian S., Sureshkumar S., Agrawal M., Michael T.P., Wessinger C., Maloof J.N., Clark R., Warthmann N., Chory J. y Weigel D. (2006a). The *PHYTOCHROME C* photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 38(6), 711-5.
- Balasubramanian S., Sureshkumar S., Lempe J. y Weigel D. (2006b). Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet.* 2(7):e106
- Bancroft I. y Dean C. (1993). Transposition pattern of the maize element Ds in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 134, 1221-1229.
- Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas J.O., Allshire R.C. y Kouzarides T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410(6824), 120-4.
- Barrero J.M., González-Bayón R., del Pozo J.C., Ponce M.R. y Micol J.L. (2007). *INCURVATA2* encodes the catalytic subunit of DNA Polymerase alpha and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19(9), 2822-38.
- Bartels D. y Ramanjulu S. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Plant Sciences* 24, 23-58.
- Bastow R., Mylne J.S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R.A. y Dean C. (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* 427, 164-167.
- Batley N.H. y Tooke F. (2002). Molecular control and variation in the floral transition. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 62-68.
- Bäurle I. y Dean C. (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125, 655-664.
- Bäurle I., Smith L., Baulcombe DC y Dean C. (2007). Widespread role for the flowering-time regulators *FCA* and *FPA* in RNA-mediated chromatin silencing. *Science* 318(5847), 109-12.
- Bell S.P., Mitchell J., Leber J., Kobayashi R. y Stillman B. (1995). The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing. *Cell* 83(4), 563-8.
- Bell S.P. y Dutta A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 333-374.
- Ben-Naim O., Eshed R., Parnis A., Teper-Bamnolker P., Shalit A., Coupland G., Samach A. y Lifschitz E. (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J.* 46, 462-476.
- Berardini T., Bollman K., Sun H. y Poethig R. (2001). Regulation of Vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by *Cyclophilin 40*. *Science* 291, 2405-2407.
- Bernatzky R. y Tanksley S.D. (1986). Toward a Saturated Linkage Map in Tomato Based on Isozymes and Random Cdna Sequences. *Genetics* 112(4), 887-898.
- Bernier G. (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 175-219.
- Bernier G. y Périlleux C. (2005). A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnol J.* 3(1), 3-16.
- Bienz M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain, *Trends Biochem. Sci.* 31, 35-40.
- Birve A., Sengupta A.K., Beuchle D., Larsson J., Kennison J.A., Rasmuson-Lestander A. y Müller J. (2001). *Su(z)12*, a novel *Drosophila* Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development* 128, 3371-3379.
- Blázquez M.A., Green R., Nilsson O., Sussman M.R. y Weigel D. (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* 10, 791-800.
- Blázquez M.A. y Weigel D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404(6780), 889-92.
- Blázquez M.A., Trénor M. y Weigel D. (2002). Independent control of gibberellin biosynthesis and flowering time by the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130(4), 1770-5.
- Blázquez M.A., Ahn J.H. y Weigel D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 33(2), 168-71.
- Bluyard J.Y. y White C.I. (2004). The *Arabidopsis* homologue of *Xrcc3* plays an essential role in meiosis. *EMBO J.* 23, 439-449.
- Bollman K., Aukerman M., Park M., Hunter C., Berardini T. y Poethig R. (2003). *HASTY*, the *Arabidopsis* ortholog of *exportin5/MSN5*, regulates phase change and morphogenesis. *Development* 130, 1493-1504.
- Bonner J. y Hamner K.C. (1938). Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. *Bot. Gaz.* 100, 388.

- Borner R., Kampmann G., Chandler J., Gleissner R., Wisman E., Apel K. y Melzer S.** (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24, 591–99.
- Bracha-Drori K., Shichrur K., Katz A., Oliva M., Angelovici R., Yalovsky S. y Ohad N.** (2004). Detection of protein-protein interactions in planusing bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* 40, 419–427.
- Bradley D., Ratcliffe O., Vincent C., Carpenter R. y Coen E.** (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275, 80–83.
- Braithwaite D.K. y Ito. J.** (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 21, 787–802.
- Brand U., Grünwald M., Hobe M. y Simon R.** (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 565–575.
- Budd M.E. y Campbell J.L.** (1993). DNA polymerases α and ϵ are required for chromosomal replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13, 496–505.
- Budd M.E. y Campbell J.L.** (1995). DNA polymerases required for repair of UV-induced damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 15, 2173–2179.
- Bundock P. y Hooykaas P.** (2002). Severe developmental defects, hypersensitivity to DNA-damaging agents, and lengthened telomeres in *Arabidopsis MRE11* mutants. *Plant Cell* 14, 2451–2462.
- Bürger D.** (1971). Die morphologischen mutanten des Göttinger *Arabidopsis*-sortiments, einschlieslich der mutanten mit abweichender samenfarbe. *Arabidopsis. Inf. Serv.* 8, 36–42.
- Burgers P.M.** (2009). Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *J. Biol. Chem.* 284(7), 4041–5.
- Callebaut I., Courvalin J.C. y Mornon J.P.** (1999). The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Lett.* 446(1), 189–93.
- Cao S., Ye M. y Jiang S.** (2005). Involvement of *GIGANTEA* gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 24(11), 683–90.
- Cao Y., Dai Y., Cui S. y Ma L.** (2008). Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of *FLOWERING LOCUS C* regulates flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 20(10), 2586–602.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N. Inzé D., Sandberg G., Casero P.J. y Bennett M.** (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13(4), 843–52.
- Caspari T., Murray J.M. y Carr A.M.** (2002). Cdc2-cyclin B kinase activity links Crb2 and Rqh1-topoisomerase III. *Genes Dev.* 16, 1195–1208.
- Castillejo C., Romera-Branchat M. y Peláz S.** (2005). A new role of the *Arabidopsis SEPALLATA3* gene revealed by its constitutive expression. *Plant J.* 43(4), 586–96.
- Chailakhyan M.K.** (1936). New facts in support of the hormonal theory of plant development. *C. R. Acad. Sci. URSS* 13, 79–83.
- Chandler J., Nardmann J y Werr W.** (2008). Plant development revolves around axes. *Trends Plant Sci.* 13(2), 78–84.
- Chandler J. y Dean C.** (1994). Factors influencing the vernalization response and flowering time of late flowering mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Exp. Bot.* 45, 1279–1288.
- Chandler J., Martinez-Zapater J.M. y Dean, C.** (2000). Mutations causing defects in the biosynthesis and response to gibberellins, abscisic acid and PHYTOCHROME B do not inhibit vernalization in *Arabidopsis fca-1*. *Planta* 210, 677– 682.
- Chardon F. y Damerval C.** (2005). Phylogenomic analysis of the *PEBP* gene family in cereals. *J. Mol. Evol.* 61, 579–90.
- Chen I.P., Hahnel U., Altschmied L., Schubert I. y Puchta Holger.** (2003). The transcriptional reponse of Arabidopsis to genotoxic stress - a high - desity colony array study (HDCA). *Plant J.* 35, 771–786
- Chen M. y Ni M.** (2006a). RFI2, a RING-domain zinc finger protein, negatively regulates CONSTANS expression and photoperiodic flowering. *Plant J.* 46(5), 823–33.
- Chen M. y Ni M.** (2006b). RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2, a RING-domain zinc finger protein, mediates phytochrome-controlled seedling deetiolation responses. *Plant Physiol.* 140(2), 457–65.
- Chen N.Z., Zhang X.Q., Wei P.C., Chen Q.J., Ren F., Chen J. y Wang X.C.** (2007). *AtHAP3b* plays a crucial role in the regulation of flowering time in *Arabidopsis* during osmotic stress. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40(6), 1083–9.

- Chen T. y Murata N.** (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Plant Biol.* 5, 250-257.
- Chiang H.H., Hwang I. y Goodman H.M.** (1997). Isolation of the *Arabidopsis* *GA4* locus. *Plant Cell* 7(2), 195-201.
- Chilkova O., Jonsson B.H. y Johansson E.** (2003). The Quaternary Structure of DNA Polymerase epsilon from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem.* 278, 16, 14082–14086.
- Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M. y Zhu J.K.** (2003). *ICE1*: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 17, 1043-1054.
- Choi K., Kim S., Kim S.Y., Kim M., Hyun Y., Lee H., Choe S., Kim S.G., Michaels S. y Lee I.** (2005). *SUPPRESSOR OF FRIGIDA3* encodes a nuclear ACTIN-RELATED PROTEIN6 required for floral repression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2647-2660.
- Choi K., Park C., Lee J., Oh M., Noh B. y Lee I.** (2007). *Arabidopsis* homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* 134, 1931-1941.
- Chou M.L. y Yang C.H.** (1998). *FLD* interacts with genes that affect different developmental phase transitions to regulate *Arabidopsis* shoot development. *Plant J.* 15(2), 231-42.
- Chouard P.** (1960). Vernalization and its relations to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11, 191–238.
- Clark A.M. y Bohnert H.J.** (1999). Cell-specific expression of genes of the lipid transfer protein family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 40(1), 69-76.
- Clark S.E., Jacobsen S.E., Levin J.Z. y Meyerowitz E.M.** (1996). The *CLAVATA* and *SHOOTMERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* 122, 1567–1575
- Clarke J.H., Tack D., Findlay K., Van Montagu M. y Van Lijsebettens M.** (1999). The *SERRATE* locus controls the formation of the early juvenile leaves and phase length in *Arabidopsis*. *Plant J.* 20, 493-501.
- Cleland C.F.** (1974). Isolation of flower-inducing and flower-inhibitory factors from aphid honeydew. *Plant Physiol.* 54, 889– 903.
- Cleland C.F. y Ajami, A.** (1974). Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiol.* 54, 904– 906.
- Coen E.S.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31-37.
- Colon-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T. y Doerner P.** (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin–GUS fusion protein. *Plant J.* 20,503–508.
- Conti L. y Bradley D.** (2007). *TERMINAL FLOWER1* is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *Plant Cell* 19, 767–78.
- Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C. y Coupland G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316, 1030–33.
- Corona D.F., Eberharter A., Budde A., Deuring R., Ferrari S., Varga-Weisz P., Wilm M., Tamkun J. y Becker, P.B.** (2000). Two histone fold proteins, CHRAC-14 and CHRAC-16, are developmentally regulated subunits of chromatin accessibility complex (CHRAC). *EMBO J.* 19, 3049–3059.
- Cools T. y De Veylder L.** (2009). DNA stress checkpoint control and plant development. *Curr Opin Plant Biol.* 12(1), 23-8.
- Coupland G.** (1995). Genetic and environmental control of flowering time in *Arabidopsis*. *Trends Genet.* 11, 393-397.
- Covington M.F., Panda S., Liu X.L., Strayer C.A., Wagner D.R. y Kay S.A.** (2001). *ELF3* modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1305–1315.
- Craig J.M.** (2004). Heterochromatin—many flavours, common themes. *Bioessays* 27: 17–28.
- Culligan K.M., Robertson C.E., Foreman J., Doerner P. y Britt A.B.** (2006). *ATR* and *ATM* play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* 48, 947–961.
- Cushman J.C.** (2001). Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *Am. Zool* 41, 758-769.
- Daniel X., Sugano S. y Tobin E.M.** (2004). CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3292–3297.
- Datta S., Hettiarachchi G.H., Deng X.W. y Holm M.** (2006). *Arabidopsis* *CONSTANS-LIKE3* is a positive regulator of red light signaling and root growth. *Plant Cell* 18, 70–84.
- De Bodt S., Raes J., Florquin K., Rombauts S., Rouzé P., Theissen G. y Van de Peer Y.** (2003). Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *J. Mol. Evol.* 56(5), 573-86.

- De Folter S., Immink R.G., Kieffer M., Parenicová L., Henz S.R., Weigel D., Busscher M., Kooiker M., Colombo L., Kater M.M., Davies B. y Angenent G.C.** (2005). Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell* 17, 1424–1433.
- De Lucia F., Crevillen P., Jones A.M., Greb T. y Dean C.** (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(44):16831-6.
- Deal R. B., Kandasamy M.K., McKinney E.C. y Meagher R.B.** (2005). The nuclear actin-related protein ARP6 is a pleiotropic developmental regulator required for the maintenance of *FLOWERING LOCUS C* expression and repression of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2633-2646.
- Dean P.J., Siwiec T., Waterworth W.M., Schlögelhofer P., Armstrong S.J. y West C.E.** (2009). A novel *ATM* dependant X-ray inducible gene is essential for both plant meiosis and gametogenesis. *Plant J. En prensa*.
- Dempsey D.A., Shah J. y Klessig D.F.** (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18, 547– 575.
- Deng W., Liu C., Pei Y., Deng X., Niu L. y Cao X.** (2007). Involvement of the histone acetyltransferase AtHAC1 in the regulation of flowering time via repression of *FLOWERING LOCUS C* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143(4), 1660-8.
- Dennis E.S., Bilodeau P., Burn J., Finnegan E.J., Genger R., Helliwell C., Kang B.J., Sheldon C.C. y Peacock W.J.** (1998). Methylation controls the low temperature induction of flowering in *Arabidopsis*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 51, 97-103.
- Devlin P.F. y Kay S.A.** (2000). Flower arranging in *Arabidopsis*. *Science* 288(5471), 1600-2.
- Di Laurenzio L., Wysocka-Diller J., Malamy J.E., Pysh L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M.G., Feldmann K.A. y Benfey P.N.** (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86, 423–433.
- Dingwall C. y Laskey R.A.** (1991). Nuclear targeting sequences - A consensus? *Trends. Biochem. Sci.* 16, 478-481.
- Doerner P., Jørgensen J.E., You R., Steppuhn J. y Lamb C.** (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380(6574):520-3.
- Dohke K., Miyazaki S., Tanaka K., Urano T., Grewal S.I. y Murakami Y.** (2008). Fission yeast chromatin assembly factor 1 assists in the replication-coupled maintenance of heterochromatin. *Genes Cells.* 13(10), 1027-43.
- Dong C.H., Agarwal M., Zhang Y., Xie Q. y Zhu J.K.** (2006). The negative regulator of plant cold responses, *HOS1*, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 8281-8286.
- Donohue K.** (2002). Germination timing influences natural selection on life-history characters in *Arabidopsis thaliana*. *Ecology* 83, 1006–1016.
- Doucet-Chabeaud G., Godon C., Brutescio C., de Murcia G. y Kazmaier M.** (2001). Ionising radiation induces the expression of *PARP-1* and *PARP-2* genes in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics.* 265 (6), 954-63.
- Doyle M.R., Davis S.J., Bastow R.M., McWatters H.G., Kozma-Bognár L., Nagy F., Millar A.J., y Amasino R.M.** (2002) The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 419, 74–77.
- Dua R., Levy D.L. y Campbell J.L.** (1998). Role of the putative zinc finger domain of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase ϵ in the DNA replication and the S/M checkpoint pathway. *J. Biol. Chem* 273, 30046-30055.
- Dua R., Levy D.L. y Campbell J.L.** (1999). Analysis of the essential functions of the C-terminal protein/protein interaction domain of *Saccharomyces cerevisiae* pol ϵ and its unexpected ability to support growth in the absence of the DNA polymerase domain. *J Biol Chem* 274, 22283- 22288.
- Dua R., Edwards S., Levy D.L. y Campbell J.L.** (2000). Subunit interactions within the *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase ϵ (POL2) complex. *J. Biol. Chem.* 275, 28816-28825.
- D'Urso G., Grallert B. y Nurse P.** (1995). DNA polymerase alpha, a component of the replication initiation complex, is essential for the checkpoint coupling S phase to mitosis in fission yeast. *J Cell Sci* 108, 3109-3118.
- D'Urso G. y Nurse P.** (1997). *Schizosaccharomyces pombe CDC20+* encodes DNA polymerase epsilon and is required for chromosomal replication but not for the S phase checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(23), 12491-6.
- Edgell D.R., Klenk H.P. y Doolittle F.** (1997). Gene duplications in evolution of archaeal family B DNA polymerases. *J. Bacteriol.* 179(8), 2632-40.

- Ehrenhofer-Murray A., Kamakaka R.T. y Rine J.** (1999). A Role for the Replication Proteins PCNA, RF-C, Polymerase epsilon and Cdc45 in Transcriptional Silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 153, 1171–1182.
- Ehsan H., Reichheld J.P., Durfee T. y Roe J.L.** (2004). TOUSLED kinase activity oscillates during the cell cycle and interacts with chromatin regulators. *Plant Physiol.* 134, 1488–1499.
- Eissenberg J.C. y Elgin S.C.** (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10(2), 204–10.
- el-Assal S.E., Alonso-Blanco C., Hanhart C.J. y Koornneef M.** (2001). Pleiotropic effects of the *Arabidopsis* *CRYPTOCHROME 2* allelic variation underlie fruit trait-related QTL. *Plant Biol (Stuttg)* 6(4), 370–4.
- Elmayan T., Proux F. y Vaucheret H.** (2005). *Arabidopsis* *RPA2*: A Genetic Link among Transcriptional Gene Silencing, DNA Repair, and DNA Replication. *Current Biology* 15, 1919–1925.
- Endo M., Ishikawa Y., Osakabe K., Nakayama S., Kaya H., Araki T., Shibahara K., Abe K., Ichikawa H., Valentine L., Hohn B. y Toki S.** (2006). Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in *Arabidopsis* CAF-1 mutants. *EMBO J.* 25, 5579–5590.
- Eriksson S., Böhlenius H., Moritz T. y Nilsson O.** (2006). GA4 is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell* 18, 2172–81.
- Evans M.M.S. y M. Barton K.** (1997). Genetics of angiosperm shoot apical meristem development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 673–701.
- Exner V., Taranto P., Schonrock N., Grisse W. y Hennig L.** (2006). Chromatin assembly factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Development* 133, 4163–4172.
- Fanti L. y Pimpinelli S.** (2008). HP1: a functionally multifaceted protein. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18(2), 169–74.
- Farré E.M., Harmer S.L., Harmon F.G., Yanovsky M.J. y Kay S.A.** (2005). Overlapping and distinct roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr. Biol.* 15, 47–54.
- Farrona S., Hurtado L., Bowman J.L. y Reyes J.C.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog *AtBRM* controls shoot development and flowering. *Development* 131, 4965–4975.
- Farrona S., Coupland G. y Turck F.** (2008). The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 19(6), 560–73.
- Feinberg A.P. y Vogelstein B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1), 6–13.
- Feldmann K.A., Marks M.D., Christianson M.L. y Quatrano R.S.** (1989). A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science* 243, 1351–1354.
- Feng W y D'Urso G.** (2001). *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking the amino-terminal catalytic domains of DNA polymerase epsilon are viable but require the DNA damage checkpoint control. *Mol. Cell Biol.* 21, 4495–504.
- Feng W., Rodriguez-Menocal L., Tolun G. y D'Urso G.** (2003). *Schizosaccharomyces pombe* Dpb2 binds to origin DNA early in S phase and is required for chromosomal DNA replication. *Mol. Biol. Cell.* 14, 3427–3436.
- Finnegan E.J., Kovac K.A., Jaligot E., Sheldon C.C., James Peacock W. y Dennis E.S.** (2005). The downregulation of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms. *Plant J.* 2005 44(3):420–32.
- Finnegan E.J. y Dennis E.S.** (2007). Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at FLC is not maintained in mitotically quiescent cells. *Curr. Biol.* 17(22):1978–83.
- Flanagan C.A., Hu Y. y Ma H.** (1996). Specific expression of the *AGL1* MADS-box gene suggests regulatory functions in *Arabidopsis* gynoecium and ovule development. *Plant J.* 10(2), 343–53.
- Fleck B. y Harberd N.P.** (2002). Evidence that the *Arabidopsis* nuclear gibberellin signalling protein GAI is not destabilised by gibberellin. *Plant J.* 32(6), 935–47.
- Fowler S., Lee K., Onouchi H., Samach A., Richardson K., Morris B., Coupland G. y Putterill J.** (1999). *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* 18, 4679–4688.
- Fox C.A., Loo S., Dillin A. y Rine J.** (1995). The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. *Genes Dev.* 9(8), 911–24.

- Fox C.A., Ehrenhofer-Murray A.E., Loo S. y Rine J.** (1997). The origin recognition complex, SIR1, and the S phase requirement for silencing. *Science* 276(5318), 1547-51.
- Franco, A. A., Lam, W. M., Burgers, P. M., y Kaufman, P. D.** (2005). Histone deposition protein ASF1 maintains DNA replisome integrity and interacts with replication factor C. *Genes Dev.* 19, 1365–1375.
- Friedberg E.C., Walker G.C. y Siede W.** (1995). DNA repair and mutagenesis. ASM Press. Washington, DC.
- Friedberg E.C., Walker G., Siede W., Wood R.D. y Schultz R. A.** (2006). DNA Repair and Mutagenesis, Ed. 2. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Fu Y., Li H. y Yang Z.** (2002). The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-Actin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis. *Plant cell*, vol 14, 777-794.
- Fuchs J., Demidov D., Houben A. y Schubert I.** (2006). Chromosomal histone modification patterns—from conservation to diversity. *Trends Plant Sci.* 11(4), 199-208.
- Fuss J. y Linn S.** (2002). Human DNA polymerase ϵ colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase. *J Biol Chem* 277, 8658-8666.
- Gallois J.L., Woodward C., Reddy G.V. y Sablowski R.** (2002). Combined *SHOOT MERISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* 129, 3207–3217.
- García-Díaz M. y Bebenek K.** (2007). Multiple functions of DNA polymerases. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* 26(2), 105–122.
- Garg P. y Burgers P.M.J.** (2005). DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit. Rev.Biochem. Mol. Biol.* 40, 115-128.
- Gaudin V., Libault M., Pouteau S., Juul T., Zhao G., Lefebvre D. y Grandjean O.** (2001). Mutations in *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1* affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development* 128, 4847–4858.
- Gazzani S., Gendall A.R., Lister C. y Dean C.** (2003). Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiol.* 132(2), 1107-14.
- Gendall A.R., Levy Y.Y., Wilson A. y Dean C.** (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* 107, 525-535.
- Germann S., Juul-Jensen T., Letarnec B. y Gaudin V.** (2006). DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling in vivo, and its use to identify putative LHP1 target loci. *Plant J.* 48(1), 153-63.
- Giavalisco P., Kapitzka K., Kolasa A., Buhtz A. y Kehr J.** (2006) Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* 6, 896–909.
- Gillissen B., Bürkle L., André B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B. y Frommer W.B.** (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12(2), 291-300.
- Gómez-Mena C., Piñeiro M., Franco-Zorrilla J.M., Salinas J., Coupland G., y Martínez-Zapater J.M.** (2001). early bolting in short days: An *Arabidopsis* mutation that causes early flowering and partially suppresses the floral phenotype of leafy. *Plant Cell* 13, 1011–1024.
- Gong Z., Koiwa H., Cushman M.A., Ray A., Bufford D., Kore-eda S., Matsumoto T.K., Zhu J., Cushman J.C., Bressan R.A. y Hasegawa P.M.** (2001). Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. *Plant Physiol.* 126(1), 363-75.
- Gong Z., Morales-Ruiz T., Ariza R.R., Roldán-Arjona T., David L. y Zhu JK.** (2002). *ROS1*, a repressor of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111(6), 803-14.
- Goodrich J., Puangsomlee P., Martin M., Long D., Meyerowitz E.M. y Coupland G.** (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386, 44–51.
- Goto N.** (1981). Enhancement of gibberellic acid effect by 5-bromodeoxyuridine, salicylic acid and benzoic acid on the flowering of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Inf. Serv.* 18, 157– 160.
- Grandin N. y Charbonneau M.** (2003). Mitotic Cyclins Regulate Telomeric Recombination in Telomerase-Deficient Yeast Cells. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9162–9177.
- Greb T., Mylne J.S., Crevillen P., Geraldo N., An H., Gendall A.R. y Dean C.** (2007). The PHD Finger Protein VRN5 Functions in the Epigenetic Silencing of *Arabidopsis* FLC. *Current Biology* 17, 73–78.
- Green E.M., Antczak A.J., Bailey A.O., Franco A.A., Wu K.J., Yates J.R. y Kaufman P.D.** (2005). Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1. *Curr. Biol.* 15(22), 2044-9.

- Gregis V., Sessa A., Colombo L. y Kater M.M.** (2006). *AGL24*, *SHORT VEGETATIVE PHASE*, and *APETALA1* redundantly control *AGAMOUS* during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18(6), 1373-82.
- Gregis V., Sessa A., Colombo L., y Kater M.M.** (2008). *AGAMOUS-LIKE24* and *SHORT VEGETATIVE PHASE* determine floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Plant J.* 56(6):891-902.
- Groth A., Rocha W., Verreault A. y Almouzni G.** (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128(4), 721-33.
- Gu X., Jiang D., Wang Y., Bachmair A. y He Y.** (2009). Repression of the floral transition via histone H2B monoubiquitination. *Plant J.* 57(3), 522-33.
- Guyomarc'h S., Vernoux T., Traas J., Zhou D.X. y Delarue M.** (2004). *MGOUN3*, an *Arabidopsis* gene with tetratricopeptide-repeat-related motifs, regulates meristem cellular organization. *J. Exp. Bot.* 55(397):673-84.
- Halas A., Policinska Z., Baranowska H. y Jachymczyk W.J.** (1999). The essential DNA polymerases delta and epsilon are involved in repair of UV-damaged DNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol.* 46, 289-298.
- Halliday K.J., Salter M.G., Thingnaes E., y Whitelam G.C.** (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator *FT*. *Plant J.* 33, 875–885.
- Hamatake R.K, Hasegawa S., Clark A.B, Bebenek K., Kunkel T.A. y Sugino A.** (1990). Purification and characterization of DNA polymerase II from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 265, 4072-4083.
- Hanson P.I. y Whiteheart S.W.** (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 519–529.
- Hartlepp K.F., Fernandez-Tornero C., Eberharter A., Grune T., Muller C.W. y Becker P.B.** (2005). The histone fold subunits of *Drosophila* CHRAC facilitate nucleosome sliding through dynamic DNA interactions. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9886–9896.
- Hartmann U., Hohmann S., Nettesheim K., Wisman E., Saedler H. y Huijser P.** (2000). Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 21, 351–360.
- Hayama R. y Coupland G.** (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol* 6, 13–19.
- Hayama R. y Coupland G.** (2004). The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 135(2):677-84.
- Hazen S.P., Schultz T.F., Pruneda-Paz J.L., Borevitz J.O., Ecker J.R. y Kay S.A.** (2005) *LUX ARRHYTHMO* encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10387–10392.
- He Y., Tang W., Swain J.D., Green A.L., Jack T.P. y Gan, S.** (2001) Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiol.* 126, 707– 716.
- He Y., Michaels S. D. y Amasino, R. M.** (2003). Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* 302, 1751-1754.
- He Y., Doyle M.R. y Amasino R.M.** (2004). PAF1-complex-mediated histone methylation of *FLOWERING LOCUS C* chromatin is required for the vernalization-responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18, 2774-2784.
- He Y. y Amasino R.M.** (2005). Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends Plant Sci.* 10, 30–35.
- Helariutta Y., Fukaki H., Wysocka-Diller J., Nakajima K., Jung J., Sena G., Hauser M.T. y Benfey P.N.** (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101, 555–567.
- Helliwell C.A., Wood C.C., Robertson M., James Peacock W. y Dennis E.S.** (2006). The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J.* 46, 183–192.
- Henderson I.R., Shindo C. y Dean C.** (2003). The need for winter in the switch to flowering. *Annu. Rev. Genet.* 37, 371–392.
- Henderson I.R. y Dean C.** (2004). Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development* 131, 3829-3838.
- Henderson I.R., Liu F., Drea S., Simpson G.G. y Dean C.** (2005). An allelic series reveals essential roles for *FY* in plant development in addition to flowering-time control. *Development* 132(16):3597-607.
- Henderson I.R. y Jacobsen S.E.** (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447(7143), 418-24.

- Hennig L., Taranto P., Walser M., Schönrock N. y Grissem W. (2003). *Arabidopsis MSI1* is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Development* 130, 2555-2565.
- Hennig, L., Bouveret, R., y Grissem, W. (2005). MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends Cell Biol.* 15, 295–302.
- Hepworth S.R., Valverde F., Ravenscroft D., Mouradov A. y Coupland G. (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *EMBO J.* 21(16), 4327-37.
- Hicks K.A., Albertson T.M. y Wagner D.R. (2001). *EARLY FLOWERING 3* encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1281–1292.
- Hiraga S.I., Hayashi A.H., Ohya T. y Sugino A. (2005). DNA polymerases alpha, delta, and epsilon localize and function together at replication forks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* 10, 297–309.
- Hoecker U. y Quail P.H. (2001). The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in *Arabidopsis*. *J. Biol.Chem.* 276, 38173–38178.
- Hoek M. y Stillman B. (2003). Chromatin assembly factor 1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12183–12188.
- Holmes A.M. y Haber J.E. (1999). Double-strand break repair in yeast cells requires both leading and lagging strand DNA polymerases. *Cell* 96, 415-424.
- Huang D., Knuuti R., Palosaari H., Pospiech H. y Syväoja, J.E. (1999). cDNA and structural organization of the gene *POLE1* for the mouse DNA polymerase ϵ catalytic subunit. *Biochim. Biophys. Acta* 1445, 363–371.
- Huang D., Jokela M., Tuusa J., Skog S., Poikonen K. y Syväoja J.E. (2001). E2F mediates induction of the Sp1-controlled promoter of the human DNA polymerase epsilon B-subunit gene *POLE2*. *Nucleic Acids Res.* 29(13), 2810-21.
- Huang T., Böhlenius H., Eriksson S., Parcy F. y Nilsson O. (2005). The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309(5741), 1694-6. **Retraction in: Böhlenius H., Eriksson S., Parcy F. y Nilsson O. (2007). Science 316(5823):367.**
- Huang M.D. y Wu W.L. (2007). Overexpression of *TMAC2*, a novel negative regulator of abscisic acid and salinity responses, has pleiotropic effects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 63(4), 557-69.
- Hübscher U., Nasheuer H.P. y Syväoja J.E. (2000). Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. *Trends Biochem. Sci.* 25(3), 143-7.
- Hunter C., Sun H., y Poethig R.S. (2003). The *Arabidopsis* heterochronic gene *ZIPPY* is an *ARGONAUTE* family member. *Curr. Biol.* 13, 1734–1739.
- Iida T. y Araki H. (2004). Noncompetitive counteractions of DNA polymerase epsilon and ISW2/yCHRA1 for epigenetic inheritance of telomere position effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 24(1), 217-27.
- Imaizumi T., Schultz T.F., Harmon F.G., Ho L.A. y Kay S.A. (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science* 309(5732), 293–297.
- Imaizumi T., Tran H.G., Swartz T.E., Briggs W.R. y Kay S.A. (2003). *FKF1* is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426, 302–306.
- Imaizumi T. y Kay S.A. (2006). Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Sci.* 11(11), 550-8.
- Inagaki S., Suzuki T., Ohto M., Urawa H., Horiuchi T., Nakamura K. y Morikami A. (2006). *Arabidopsis TEBICHI*, with Helicase and DNA Polymerase Domains, Is Required for Regulated Cell Division and Differentiation in Meristems. *Plant Cell*, Vol. 18, 879–892.
- Ira G., Pelliccioli A., Balijja A., Wang X., Fiorani S., Carotenuto W., Liberi G., Bressan D., Wan L., Hollingsworth N. M., Haber J. E. y Foiani M. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require *CDK1*. *Nature* 431, 1011–1017.
- Ishikawa M., Kiba T. y Chua N.H. (2006). The *Arabidopsis SPA1* gene is required for circadian clock function and photoperiodic flowering. *Plant J.* 46, 736–746.
- Jacobsen S.E. y Olszewski N.E. (1993). Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 5, 887– 896.
- Jacobsen S.E., Binkowski K.A. y Olszewski N.E. (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(17), 9292-6.

- Jang S., Marchal V., Panigrahi K.C., Wenkel S., Soppe W., Deng X.W., Valverde F. y Coupland G. (2008). *Arabidopsis COP1* shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J.* 27(8), 1277-88.
- Jarillo J.A., del Olmo I., Gómez-Zambrano A., Lázaro A., López-González L., Miguel E., Narro-Diego L., Sáez D. y Piñeiro M. (2008). Review. Photoperiodic control of flowering time. *Span. J. Agri.* 6 (Special issue), 221-244.
- Jarillo J.A., Piñeiro M., Cubas P., Martínez-Zapater J.M. (2009). Chromatin remodeling in plant development. *Int J Dev Biol.*
- Jenik P.D., Jurkuta R.E. y Barton M.K. (2005). Interactions between the Cell Cycle and Embryonic Patterning in *Arabidopsis* Uncovered by a Mutation in DNA Polymerase ϵ . *Plant Cell* 17, 3362–3377.
- Jessberger R., Podust V., Hübscher U. y Berg P. (1993). A mammalian protein complex that repairs double-strand breaks and deletions by recombination. *J. Biol. Chem.* 268(20), 15070-9.
- Jiang D., Yang W., He Y. y Amasino R.M. (2007). *Arabidopsis* relatives of the human lysine-specific Demethylase1 repress the expression of *FWA* and *FLOWERING LOCUS C* and thus promote the floral transition. *Plant Cell* 19(10), 2975-87.
- Jiang D., Wang Y., Wang Y. y He Y. (2008). Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the *Arabidopsis* Polycomb Repressive Complex 2 Components. *PLoS ONE.* 3(10):e3404.
- Jin J.B., Jin Y.H., Lee J., Miura K., Yoo C.Y., Kim W.Y., Van Oosten M., Hyun Y., Somers D.E., Lee I., Yun D.J., Bressan R.A. y Hasegawa P.M. (2008). The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on *FLC* chromatin structure. *Plant J.* 53(3), 530-40.
- Johanson U., West J., Lister C., Michaels S., Amasino R. y Dean C. (2000). Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science.* 290(5490), 344-7.
- Kamakaka R.T. y Biggins S. (2005). Histone variants: deviants? *Genes Dev.* 19, 295-310.
- Kandasamy M.K., Deal R.B., McKinney E.C. y Meagher R.B. (2005). Silencing the nuclear actin-related protein *AtARP4* in *Arabidopsis* has multiple effects on plant development, including early flowering and delayed floral senescence. *Plant J.* 41, 845-858.
- Kapoor A., Agarwal M., Andreucci A., Zheng X., Gong Z., Hasegawa P.M., Bressan R.A. y Zhu J.K. (2005a). Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA-methylation-independent manner in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 15(21), 1912-8.
- Kapoor A., Agius F. y Zhu J.K. (2005b). Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett.* 579(26), 5889-98.
- Kardailsky I., Shukla V.K., Ahn J.H., Dagenais N., Christensen S.K., Nguyen J.T., Chory J. Harrison M.J. y Weigel D. (1999). Activation Tagging of the Floral Inducer *FT*. *Science*, 286, 1962-1965.
- Katz A., Oliva M., Mosquna A., Hakim O. y Ohad N. (2004). FIE and CURLY LEAF polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *Plant J.* 37, 707–719.
- Kaya H., Shibahara K.I., Taoka K.I., Iwabuchi M., Stillman B. y Araki, T. (2001). *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104, 131–142.
- Keller C. y Krude T. (2000). Requirement of Cyclin/Cdk2 and Protein Phosphatase 1 Activity for Chromatin Assembly Factor 1-dependent Chromatin Assembly during DNA Synthesis. *J. Biol. Chem.* 275, 35512-35521.
- Kerstetter R.A y Hake S. (1997). Shoot Meristem Formation in Vegetative Development. *Plant Cell*, Vol. 9, 1001-1010.
- Kesti T., Flick K., Keränen S., Syväoja J.E. y Wittenberg C. (1999). DNA polymerase ϵ catalytic domains are dispensable for DNA replication, DNA repair, and cell viability. *Mol Cell* 3, 679-685.
- Kesti T., McDonald W.H., Yates J.R. 3rd y Wittenberg C. (2004). Cell cycle-dependent phosphorylation of the DNA polymerase epsilon subunit, Dpb2, by the Cdc28 cyclin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* 279, 14245–14255.
- Kim H.J., Hyun Y., Park J.Y., Park M.J., Park M.K., Kim M.D., Kim H.J., Lee M.H., Moon J., Lee I. y Kim J. (2004). A genetic link between cold responses and flowering time through *FVE* in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 36, 167-171.
- Kim S., Choi K., Park C., Hwang H. y Lee I. (2006). *SUPPRESSOR OF FRIGIDA4*, Encoding a C2H2-Type Zinc Finger Protein, Represses Flowering by Transcriptional Activation of *Arabidopsis FLOWERING LOCUS C*. *Plant Cell* 18, 2985–2998.

- Kim S.Y., He Y., Jacob Y., Noh Y.S., Michaels S. y Amasino R.** (2005b). Establishment of the vernalization-responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis* requires a putative histone H3 methyl transferase. *Plant Cell* 17, 3301-3310.
- Kim S.Y. y Michaels S.D.** (2006). *SUPPRESSOR OF FRI 4* encodes a nuclear-localized protein that is required for delayed flowering in winter-annual *Arabidopsis*. *Development* 133, 4699-4707.
- Kim S.Y., Kim S.G., Kim Y.S., Seo P.J., Bae M., Yoon H.K. y Park C.M.** (2007b). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res.* 35(1), 203-213.
- Kim W.Y., Hicks K.A. y Somers D.E.** (2005a). Independent roles for *EARLY FLOWERING 3* and *ZEITLUPE* in the control of circadian timing, hypocotyl length, and flowering time. *Plant Physiol.* 139, 1557-1569.
- Kim W.Y., Fujiwara S., Suh S.S., Kim J., Kim Y., Han L., David K., Putterill J., Nam H.G. y Somers D.E.** (2007a). *ZEITLUPE* is a circadian photoreceptor stabilized by *GIGANTEA* in blue light. *Nature* 449(7160), 356-60.
- King R.W. y Evans L.T.** (2003). Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the "florigen" black box. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 307-28.
- King K.E., Moritz T. y Harberd N.P.** (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of *GAI* and *RGA*. *Genetics* 159(2), 767-76.
- Kinoshita T., Harada J.J., Goldberg R.B. y Fischer R.L.** (2001). Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14156-14161.
- Kirchmaier A.L. y Rine J.** (2001). DNA replication-independent silencing in *S. cerevisiae*. *Science* 291(5504), 646-50.
- Kirik A., Pecinka A., Wendeler E. y Reiss B.** (2006). The chromatin assembly factor subunit FASCIATA1 is involved in homologous recombination in plants. *Plant Cell* 18, 2431-2442.
- Knott J.E.** (1934). Effect of localized photoperiod on spinach. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 31, 152-154.
- Kobayashi Y., Kaya H., Goto K., Iwabuchi M. y Araki T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286, 1960-62.
- Kobayashi Y. y Weigel D.** (2007). Move on up, it's time for change--mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev.* 21(19):2371-84.
- Kobor M.S., Venkatasubrahmanyam S., Meneghini M.D., Gin J.W., Jennings J.L., Link A.J., Madhani H.D. y Rine J.** (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* 2, 0587-0599.
- Köhler C., Hennig L., Bouveret R., Gheyselinck J., Grossniklaus U. y Grissem W.** (2003). *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *EMBO J.* 22, 4804-4814.
- Köhler C. y Villar C.B.** (2008). Programming of gene expression by Polycomb group proteins. *Trends Cell Biol.* 18(5), 236-43.
- Kolár J, Senková J.** (2008). Reduction of mineral nutrient availability accelerates flowering of *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 165(15):1601-9.
- Koncz C., Mayerhof R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Reiss B. Redei G.P. y Schell J.** (1990). Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 9, 1337-1346.
- Koornneef M. y Van der Veen J.H** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Ther Appl Genet* 58, 257-263.
- Koornneef M., Eden J., Hanhart C.J., Jongh J.A.M.** (1983). Genetic fine structure of the *GA-1* locus in the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Genetical Res.* 41, 57-68.
- Koornneef M., Elgersma A., Hanhart C.J., Loenen Martinet E.P.** (1985). New linkage data of chromosome 1 with a case of very close linkage of three genes affecting plant height. *Arabid. Inf. Serv.* 22, 43-48.
- Koornneef M., Hanhart C.J. y Van Der Veen J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 229, 57-66.
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart C.J. y Peeters A.J.M.** (1998a). Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 148, 885-892.
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A.J.M. y Soppe W.** (1998b). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49, 345-370.
- Koornneef M., Alonso-Blanco C. y Vreugdenhil D.** (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Plant Biology* 55, 141-172.

- Kosarev P., Mayer K.F. y Hardtke C.S. (2002). Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. *Genome Biol.* 3(4) RESEARCH0016.
- Kotake T., Takada S., Nakahigashi K., Ohto M. y Goto K. (2003). *Arabidopsis* *TERMINAL FLOWER 2* gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both *FLOWERING LOCUS T* to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *Plant Cell Physiol.* 44, 555–564.
- Krichevsky A., Gutgarts H., Kozlovsky S.V., Tzfira T., Sutton A., Sternglanz R., Mandel G. y Citovsky V. (2007). C2H2 zinc finger-SET histone methyltransferase is a plant-specific chromatin modifier. *Dev. Biol.* 303(1), 259–69.
- Krogan N.J., Dover J., Wood A., Schneider J., Heidt J., Boateng M.A., Dean K., Ryan O.W., Golshani A. y Johnston M. (2003). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: Linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol. Cell* 11, 721–729.
- Krude T. (1995). Chromatin. Nucleosome assembly during DNA replication. *Curr. Biol.* 5, 1232–1234.
- Krude T. (1999). Chromatin assembly during DNA replication in somatic cells. *Eur. J. Biochem.* 263, 1–5.
- Kwon C.S., Chen C. y Wagner D. (2005). *WUSCHEL* is a primary target for transcriptional regulation by *SPLAYED* in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 19, 992–1003.
- Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K. y Jenuwein T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410(6824), 116–20.
- Langridge J. (1957) Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis*. *Nature*, 180, 36– 37.
- Larsson A.S., Landberg K. y Meeks-Wagner D.R. (1998) The *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)* gene controls the reproductive transition and meristem identity in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149, 597–605.
- Laubinger S., Marchal V., Le Gourrierc J., Wenkel S., Adrian J., Jang S., Kulajta C., Braun H., Coupland G. y Hoecker U. (2006). *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* 133, 3213–3222.
- Lázaro A., Gómez-Zambrano A., López-González L., Piñeiro M. y Jarillo J.A. (2008). Mutations in the *Arabidopsis* *SWC6* gene, encoding a component of the SWR1 chromatin remodelling complex, accelerate flowering time and alter leaf and flower development. *J. Exp. Bot.* 59(3):653–66.
- Le Douarin B., Nielsen A.L., Garnier J.M., Ichinose H., Jeanmougin F., Losson R. y Chambon P. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 6701–6715.
- Lee I., Aukerman M.J., Gore S.L., Lohman K.N., Michaels S.D., Weaver L.M., John M.C., Feldmann K.A. y Amasino R.M. (1994). Isolation of *LUMINIDEPENDENS*: a gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6(1):75–83.
- Lee H., Suh S.S., Park E., Cho E., Ahn J.H., Kim S.G., Lee J.S., Kwon Y.M. y Lee I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 14, 2366– 76.
- Lee H., Xiong L., Gong Z., Ishitani M., Stevenson B. y Zhu J.K. (2001). The *Arabidopsis* *HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning. *Genes and Development* 15, 912–924.
- Lee I. (2005). Multiple regulatory mechanisms of the floral repressor *FLC*, a gene conferring a vernalization requirement in *Arabidopsis*. *Flowering Newsl.* 40, 52– 59.
- Lee J., Yoo S.J., Park S.H., Hwang I., Lee J.S. y Ahn J.H. (2007a). Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 15;21(4), 397–402.
- Lee J., Nam J., Park H.C., Na G., Miura K., Jin J.B., Yoo C.Y., Baek D., Kim D.H. y Jeoung J.C. (2007b). Salicylic acid-mediated innate immunity in *Arabidopsis* is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant J.* 49, 79–90.
- Lee J., Miura K., Bressan R.A., Hasegawa P.M. y Yun D.J. (2007c). Regulation of plant innate immunity by SUMO E3 ligase. *Plant Signal Beha.* 2, 253–254.
- Lee J., Oh M., Park H. y Lee I. (2008). SOC1 translocated to nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *Plant J.* 55(5):832–43.
- Lenhard M., Jürgens G. y Laux T. (2002). The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfill complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristematic regulation. *Development* 129, 3195–3206.
- Levy Y.Y., Mesnage S., Mylne J.S., Gendall A.R. y Dean C. (2002). Multiple roles of *Arabidopsis* *VRN1* in vernalization and flowering time control. *Science* 297(5579), 243–6.

- Leyser H.M. y Furner I.J.** (1992). Characterization of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 116, 397–403.
- Li D., Liu C., Shen L., Wu Y., Chen H., Robertson M., Helliwell C.A., Ito T., Meyerowitz E. y Yu H.** (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 15(1), 110-20.
- Li S., Blanchoin L., Yang Z. y Lord E. M.** (2003). The putative *Arabidopsis* Arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiol.* 132, 2034-2044.
- Li Y., Asahara H., Patel V.S., Zhou S. y Linn S.** (1997). Purification, cDNA cloning, and gene mapping of the small subunit of human DNA polymerase epsilon. *J. Biol. Chem.* 272, 32337-32344.
- Li Y., Pursell Z.F. y Linn S.** (2000). Identification and cloning of two histone fold motif-containing subunits of HeLa DNA polymerase ϵ . *J Biol Chem* 275, 23247-23252.
- Li Y, Kirschmann D.A. y Wallrath L.L.** (2002). Does HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 always follow code? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99 Suppl 4, 16462-9.
- Li Y., Roycewicz P., Smith E. y Borevitz J.O.** (2006). Genetics of local adaptation in the laboratory: flowering time quantitative trait loci under geographic and seasonal conditions in *Arabidopsis*. *PLoS ONE.* 1:e105.
- Li Y.C., Cheng T.H. y Gartenberg M.R.** (2001). Establishment of transcriptional silencing in the absence of DNA replication. *Science* 291, 650-653.
- Libault M., Tessadori F., Germann S., Snijder B, Fransz P. y Gaudin V.** (2005). The *Arabidopsis* LHP1 protein is a component of euchromatin. *Planta* 222, 910–925.
- Lim M.H., Kim J., Kim Y.S., Chung K.S., Seo Y.H., Lee I., Kim J., Hong C.B., Kim H.J. y Park C.M.** (2004). A new *Arabidopsis* gene, *FLK*, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via *FLOWERING LOCUS C*. *Plant Cell* 16(3):731-40.
- Lin M.K., Belanger H., Lee Y.J., Varkonyi-Gasic E., Taoka K., Miura E., Xoconostle-Cázares B., Gendler K., Jorgensen R.A., Phinney B., Lough T.J. y Lucas W.J.** (2007). *FLOWERING LOCUS T* protein may act as the long-distance florigenic signal in the Cucurbits, *Plant Cell* 19, 1488–1506.
- Liu C., Zhou J., Bracha-Drori K., Yalovsky S., Ito T. y Yu H.** (2007b). Specification of *Arabidopsis* floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development.* 134(10), 1901-10.
- Liu C., Chen H., Er H.L., Soo H.M., Kumar P.P., Han J.H., Liou Y.C. y Yu H.** (2008b). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development.* 2008, 135(8), 1481-91.
- Liu F., Quesada V., Crevillén P., Bäurle I., Swiezewski S. y Dean C.** (2007a). The *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate *FLC*. *Mol. Cell* 9;28(3), 398-407.
- Liu H. y Wang Y.** (2006). The function and regulation of budding yeast SWE1 in response to interrupted DNA synthesis. *Mol. Biol. Cell.* 17(6), 2746-56.
- Liu L.J., Zhang Y.C., Li Q.H., Sang Y., Mao J., Lian H.L., Wang L. y Yang H.Q.** (2008a). COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20(2), 292-306.
- Liu X.L., Covington M.F., Fankhauser C., Chory J. y Wagner D.R.** (2001). *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell* 13, 1293–1304.
- Long, D., Martin, M., Sundberg, E., Swinburne, J., Puangsomlee, P. y Coupland, G.** (1993). The maize transposable element system *Ac/Ds* as a mutagen in *Arabidopsis*: identification of an albino mutation induced by *Ds* insertion. *Proc. Natl Acad. Sci, USA*, 90, 10 370-10 374.
- Long, D.** (1997). *Ds* elements on all five *Arabidopsis* chromosomes and assessment of their utility for transposon tagging. *Plant J.* 11(1), 145-148.
- Lou H., Komata M., Katou Y., Guan Z., Reis C.C., Budd M., Shirahige K. y Campbell J.L.** (2008). Mrc1 and DNA polymerase epsilon function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint. *Mol Cell.* 32(1), 106-17.
- Long J.A., Moan E.I., Medford J.I. y Barton M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379, 66–69.
- Ma S., Gong Q. y Bohnert H.J.** (2006). Dissecting salt stress pathways. *J. Exp. Bot.* 2006;57(5), 1097-107.
- Macknight R., Bancroft I., Page T., Lister C., Schmidt R., Love K., Westphal L., Murphy G., Sherson S., Cobbett C. y Dean C.** (1997). *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell* 89(5), 737-45.

- Macknight R., Duroux M., Laurie R., Dijkwel P., Simpson G. y Dean C.** (2002). Functional significance of the alternative transcript processing of the *Arabidopsis* floral promoter *FCA*. *Plant Cell* 14, 877-888.
- MacNeill S.A., Moreno S., Reynolds N., Nurse P. y Fantes P.A.** (1996). The fission yeast Cdc1 protein, a homologue of the small subunit of DNA polymerase δ , binds to Pol3 and Cdc27. *EMBO J.* 15, 4613-4628.
- Maity S.N., y de Crombrughe B.** (1998). Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends Biochem. Sci.* 23, 174-178.
- Maldonado E., Sciekhattar R., Sheldon M., Cho H., Drapkin R., Rickert P., Lees E., Anderson C.W., Linn S. y Reinberg D.** (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature* 381, 86-89.
- Maldonado A.M., Doerner P., Dixon R.A., Lamb C.J. y Cameron R.K.** (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*. 419(6905), 399-403.
- Mantovani R.** (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239, 15-27.
- March-Díaz R., García-Domínguez M., Florencio F.J. y Reyes J.C.** (2007). SEF, a new protein required for flowering repression in *Arabidopsis*, interacts with PIE1 and ARP6. *Plant Physiol.* 143(2), 893-901.
- Martínez C., Pons E., Prats G. y León J.** (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J.* 37(2), 209-17.
- Martínez-Zapater J.M. y Somerville C.R.** (1990). Effect of Light Quality and Vernalization on Late-Flowering Mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 92(3), 770-776.
- Martínez-Zapater J.M., Coupland G., Dean C., y Koorneef M.** (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Lab. Press. 403-433.
- Martín-Trillo M., Lázaro A., Poethig R. S., Gómez-Mena C., Piñeiro M., Martínez-Zapater J.M. y Jarillo J.A.** (2006). *EARLY IN SHORT DAYS 1* (esd1) encodes ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (AtARP6), a putative component of chromatin remodelling complexes that positively regulates FLC accumulation in *Arabidopsis*. *Development*, 133, 1241-1252.
- Más P., Kim W.Y., Somers D.E. y Kay S.A.** (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 426, 567-570.
- Más P.** (2008). Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends Cell Biol.* 18(6), 273-81.
- Masumoto H., Sugino A. y Araki H.** (2000). Dpb11 controls the association between DNA polymerases alpha and epsilon and the autonomously replicating sequence region of budding yeast. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2809-2817.
- Mathieu J., Warthmann N., Kuttner F. y Schmid M.** (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 17, 1055-60.
- Mathur J., Mathur N., Kernebeck B. y Hülskamp M.** (2003). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1632-1645.
- Mattioli R., Marchese D., D'Angeli S., Altamura M.M., Costantino P. y Trovato M.** (2008). Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 66(3), 277-88.
- McWatters H.G., Bastow R.M., Hall A. y Millar A.J.** (2000). The *ELF3* zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408, 716-720.
- Meagher R.B., Deal R.B., Kandasamy M.K. y McKinney E.C.** (2005). Nuclear actin-related proteins as epigenetic regulators of development. *Plant Physiol.* 139, 1576-1585.
- Medford J.I., Behringer F.J., Callos J.D. y Feldman K.A.** (1992). Normal and abnormal development in the *Arabidopsis* vegetative shoot apex. *Plant Cell* 4, 631-643.
- Menges M., de Jager S., Grisse W. y Murray J.** (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis*. *Plant J.* 41, 546-566.
- Michaels S.D. y Amasino R.M.** (1999a). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11, 949-956.
- Michaels S.D. y Amasino R.M.** (1999b). The gibberellic acid biosynthesis mutant *ga1-3* of *Arabidopsis thaliana* is responsive to vernalization. *Dev. Genet.* 25, 194-198.
- Michaels S.D. y Amasino R.M.** (2000). Memories of winter: Vernalization and the competent to flower. *Plant Cell Environ.* 23, 1145-1154.

- Michaels S.D. y Amasino R.M.** (2001). Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell*, 13, 935-941.
- Michaels S.D., He Y., Scortecci K.C. y Amasino R.M.** (2003a). Attenuation of *FLOWERING LOCUS C* activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(17), 10102-7.
- Michaels S.D., Ditta G., Gustafson-Brown C., Peláz S., Yanofsky M. y Amasino R.M.** (2003b). *AGL24* acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. *Plant J.* 33(5), 867-74.
- Michaels S.D., Bezerra I.C. y Amasino R.M.** (2004). *FRIGIDA*-related genes are required for the winter-annual habit in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(9), 3281-5.
- Michaels S.D., Himelblau E., Kim S.Y., Schomburg F.M. y Amasino R.M.** (2005). Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 149–56.
- Micklem G., Rowley A., Harwood J., Nasmyth K. y Diffley J.F.** (1993). Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature* 366(6450), 87-9.
- Mimida N., Goto K., Kobayashi Y., Araki T., Ahn J.H., Weigel D., Murata M., Motoyoshi F. y Sakamoto W.** (2001). Functional divergence of the TFL1-like gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. *Genes Cells.* 6(4), 327-36.
- Mitchell P.J. y Tjian R.** (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245, 371-378.
- Miura K., Rus A., Sharkhuu A., Yokoi S., Karthikeyan A.S., Raghothama K.G., Baek D., Koo Y.D., Jin J.B. y Bressan R.A.** (2005). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 7760-7765.
- Miura K., Jin J.B., Lee J., Yoo C.Y., Stirn V., Miura T., Ashworth E.N., Bressan R.A., Yun D.J. y Hasegawa P.M.** (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls *CBF3/DREB1A* expression and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19, 1403-1414.
- Mizoguchi T., Wheatley K., Hanzawa Y., Wright L., Mizoguchi M., Song H.R., Carré I.A. y Coupland G.** (2002). *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 2(5), 629-41.
- Mizoguchi T., Wright L., Fujiwara S., Cremer F., Lee K., Onouchi H., Mouradov A., Fowler S., Kamada H., Putterill J. y Coupland G.** (2005) Distinct roles of *GIGANTEA* in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2255–2270
- Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W.H., Sen S. y Wu C.** (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.
- Mizukami Y. y Fischer R.** (2000). Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(2), 942-947.
- Mizuno T.** (2005). Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2263–2276.
- Mizuno T. y Nakamichi N.** (2005). Pseudo-Response Regulators (PRRs) or True Oscillator Components (TOCs). *Plant Cell Physiol.* 46, 677–685.
- Mockler T.C., Yu X., Shalitin D., Parikh D., Michael T.P., Liou J., Huang J., Smith Z., Alonso J.M., Ecker J.R., Chory J y Lin C.** (2004). Regulation of flowering time in *Arabidopsis* by K homology domain proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(34), 12759-64.
- Moon J., Suh S.S., Lee H., Choi K.R., Hong C.B., Paek N.C., Kim S.G. y Lee I.** (2003). The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.* 35(5), 613-23.
- Moon J., Lee H., Kim M. y Lee I.** (2005). Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 46(2), 292-9.
- Morris K., MacKerness S.A., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P. y Buchanan-Wollaston V.** (2000) Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant J.* 23, 677– 685.
- Morrison A., Araki H., Clark A.B., Hamatake R.K. y Sugino A.** (1990). A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell* 62, 1143-1151.

- Morrison A. y Sugino A.** (1994). The 3'→5' exonucleases of both DNA polymerases δ and ϵ participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 242, 289-296.
- Mouradov A., Cremer F. y Coupland G.** (2002). Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 14, 111-130.
- Murtas G., Reeves P.H., Fu Y-F., Bancroft I., Dean C. y Coupland G.** (2003). A nuclear protease required for flowering-time regulation in *Arabidopsis* reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates. *Plant Cell* 15, 2308-2319.
- Murzina N., Verreault A., Laue E. y Stillman B.** (1999). Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1 and HP1 proteins. *Mol Cell*. 4(4), 529-40.
- Mylne J.S., Barrett L., Tessadori F., Mesnage S., Johnson L., Bernatavichute Y.V., Jacobsen S.E., Fransz P. y Dean C.** (2006). LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of *FLC*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103, 5012–5017.
- Nakahigashi K., Jasencakova Z., Schubert I. y Goto K.** (2005). The *Arabidopsis* HETEROCHROMATIN PROTEIN1 homolog (*TERMINAL FLOWER2*) silences genes within the euchromatic region but not genes positioned in heterochromatin. *Plant Cell Physiol* 46, 1747–1756.
- Nakamichi N., Kita M., Ito S., Yamashino T. y Mizuno T.** (2005). PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, *PRR9*, *PRR7* and *PRR5*, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 46(5):686-98. Epub 2005 Mar 13.
- Nakamichi N, Kita M, Niinuma K, Ito S, Yamashino T, Mizoguchi T y Mizuno T.** (2007). *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators *PRR9*, *PRR7* and *PRR5* coordinately and positively regulate flowering time through the canonical *CONSTANS*-dependent photoperiodic pathway. *Plant Cell Physiol*. 48(6), 822-32.
- Nakatani Y., Tagami H. y Shestakova E.** (2006). How is epigenetic information on chromatin inherited after DNA replication? *Ernst. Schering. Res. Found Workshop* 57, 89-96.
- Nakayama J., Allshire R.C, Klar A.J.S. y Grewal S.I.S.** (2001). A role for DNA polymerase alpha in epigenetic control of transcriptional silencing in fission yeast. *The EMBO J.* 20 (11), 2857-2866.
- Napp-Zinn K.** (1957). Untersuchungen über das Vernalisationsverhalten einer winterannuellen Rasse von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 50, 177210.
- Napp-Zinn K.** (1985). *Arabidopsis thaliana*. In: *CRC Handbook of Flowering*. (ed. A.H. Halevy) 492-503. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- Navas T.A., Zhou Z. y Elledge S.J.** (1995). DNA polymerase epsilon links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell* 80, 29–39.
- Nelson D.C., Lasswell J., Rogg L.E., Cohen M.A. y Bartel B.** (2000). *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101, 331–340.
- Neuwald A.F., Aravind L., Spouge J.L. y Koonin E.V.** (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9, 27–43.
- Neuwald A.F.** (2005). Evolutionary clues to eukaryotic DNA clamp-loading mechanisms: analysis of the functional constraints imposed on replication factor C AAA+ ATPases. *Nucleic Acids Res.* 33, 3614–3628.
- Ng H.H., Robert F., Young R. A. y Struhl K.** (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol. Cell* 11, 709-719.
- Nick McElhinny S.A, Gordenin D.A., Stith C.M., Burgers P.M.J. y Kunkel T.A.** (2008). Division of labor at the eukaryotic replication fork. *Mol. Cell* 30(2), 137–44.
- Nilsson O., Lee I., Blázquez M.A. y Weigel, D.** (1998). Flowering-time genes modulate the response to *LEAFY* activity. *Genetics* 150(1):403-10.
- Nishida C., Reinhard P. y Linn S.** (1988). DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase ϵ . *J. Biol. Chem.* 263, 501-510.
- Niu L., Lu F., Pei Y., Liu C. y Cao X.** (2007). Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase *AtPRMT10*. *EMBO J.* 8, 1190–1195.
- Niu L., Zhang Y., Pei Y., Liu C. y Cao X.** (2008). Redundant requirement for a pair of *PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 4* homologs for the proper regulation of *Arabidopsis* flowering time. *Plant Physiol.* 148, 490–503.

- Noh B., Lee S.H., Kim H.J., Yi G., Shin E.A., Lee M., Jung K.J., Doyle M.R., Amasino R.M. y Noh Y.S. (2004). Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of *Arabidopsis* flowering time. *Plant Cell* 16, 2601-2613.
- Noh Y.S. y Amasino R.M. (2003). *PIE1*, an ISWI family gene, is required for *FLC* activation and floral repression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1671-1682.
- Nord E.A. y Lynch J.P. (2008). Delayed reproduction in *Arabidopsis thaliana* improves fitness in soil with suboptimal phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* 31(10), 1432-41.
- Nuutinen T., Tossavainen H., Fredriksson K., Pirilä P., Permi P., Pospiech H. y Syvaaja J.E. (2008). The solution structure of the amino-terminal domain of human DNA polymerase epsilon subunit B is homologous to C-domains of AAA+ proteins. *Nucleic Acids Res.* 36(15), 5102-10.
- Nyberg K.A., Michelson R.J., Putnam C.W. y Weinert T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* 36:617-56.
- Oh S., Zhang H., Ludwig P. y Van Nocker S. (2004). A mechanism related to the yeast transcriptional regulator Paf1c is required for expression of the *Arabidopsis FLC/MAF* MADS box gene family. *Plant Cell* 16, 2940-2953.
- Oh S., Park S. y Van Nocker S. (2008). Genic and global functions for Paf1C in chromatin modification and gene expression in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 4(8):e1000077.
- Ohya T., Maki S., Kawasaki Y. y Sugino A. (2000) Structure and function of the fourth subunit (DPB4p) of DNA polymerase ϵ . in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid Res* 28, 3846-3852.
- Onai K. e Ishiura M. (2005). *PHYTOCLOCK 1* encoding a novel GARP protein essential for the *Arabidopsis* circadian clock. *Genes Cells* 10, 963–972.
- Onouchi H., Igeno M.I., Perilleux C., Graves K. y Coupland G. (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell* 12, 885–900.
- Osakabe K., Abe K., Yamanouchi H., Takyuu T., Yoshioka T., Ito Y., Kato T., Tabata S., Kurei S., Yoshioka Y., Machida Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Ichikawa H. y Toki S. (2005). *Arabidopsis Rad51B* is important for double-stranded DNA breaks repair in somatic cells. *Plant Mol Biol* 57, 819–833.
- Park B.O, Sang W.G., Yeu S.Y., Choi Y.D., Paek N.C., Kim M.C., Song J.T. y Seo H.S. (2007). Post-translational regulation of FLC is mediated by an E3 ubiquitin ligase activity of *SINAT5* in *Arabidopsis*. *Plant Science* 173, 269–275.
- Park S. y Kim K.N. (2007). A Novel Nuclear Protein Associated with CIPK11 Is Involved in Salt Response of *Arabidopsis*. 18TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON *ARABIDOPSIS* RESEARCH.
- Pascucci B., Stucki M., Jónsson Z.O., Dogliotti E. y Hübscher U. (1999). Long batch base excision repair with purified human proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 33696-33702.
- Parlanti E., Locatelli G., Maga G. y Dogliotti E. (2007). Human base excision repair complex is physically associated to DNA replication and cell cycle regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, 1569–1577.
- Pavlov Y.I., Maki S., Maki H., Kunkel T.A. (2004). Evidence for interplay among yeast replicative DNA polymerases alpha, delta and epsilon from studies of exonuclease and polymerase active site mutations. *BMC Biology* 2, 11.
- Peláz S., Ditta G.S., Baumann E., Wisman E. y Yanofsky M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature.* 405(6783), 200-3.
- Pei Y., Niu L., Lu F., Liu C., Zhai J., Kong X. y Cao X. (2007). Mutations in the Type II protein arginine methyltransferase *AtPRMT5* result in pleiotropic developmental defects in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144(4), 1913-23.
- Phillips A.L., Ward D.A., Uknes S., Appleford N.E., Lange T., Huttly A.K., Gaskin P., Graebe J.E. y Hedden P. (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 108(3), 1049-57.
- Pien S. y Grossniklaus U. (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* 1769(5-6):375-82.
- Pien S., Fleury D., Mylne J.S., Crevillen P., Inzé D., Avramova Z., Dean C. y Grossniklaus U. (2008). *ARABIDOPSIS TRITHORAX1* Dynamically Regulates *FLOWERING LOCUS C* Activation via Histone 3 Lysine 4 Trimethylation. *Plant Cell* 20, 580-588.
- Pigliucci M. (2003). Selection in a model system: ecological genetics of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Ecology* 84, 1700–1712.

- Piñeiro M., Gómez-Mena C., Schaffer R., Martínez-Zapater J.M. y Coupland G. (2003). *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS* is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in *Arabidopsis* by repressing FT. *Plant Cell* 15(7), 1552-62.
- Polo S.E. y Almouzni G. (2006). Chromatin assembly, a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* 16, 104-111.
- Poot R.A., Dellaire G., Hulsmann B.B., Grimaldi M.A., Corona D.F., Becker P.B., Bickmore W.A. y Varga-Weisz P.D. (2000). HuCHRAc, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *EMBO J.* 19, 3377-3387.
- Pouteau S., Ferret V., Gaudin V., Lefebvre D., Sabar M., Zhao G. y Prunus F. (2004). Extensive Phenotypic Variation in Early Flowering Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 201-211.
- Pouteau S., Carre I., Gaudin V., Ferret V., Lefebvre D. y Wilson M. (2008). Diversification of photoperiodic response patterns in a collection of early flowering mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148(3), 1465-73.
- Puchta H. (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J. Exp. Bot.* 56, 1-14.
- Pursell Z.F., Isoz I., Lundström E.B., Johansson E. y Kunkel T.A. (2007a). Regulation of B family DNA polymerase fidelity by a conserved active site residue: characterization of M644W, M644L and M644F mutants of yeast DNA polymerase epsilon. *Nucleic Acids Res.* 35(9), 3076-86.
- Pursell Z.F., Isoz I., Lundström E.B., Johansson E. y Kunkel T.A. (2007b). Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication. *Science* 317 (5834), 127-30.
- Pursell Z.F. y Kunkel T.A. (2008). DNA Polymerase epsilon: A Polymerase of Unusual Size (and Complexity). *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 82:101-45.
- Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R. y Coupland G. (1995). The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80, 847-857.
- Putterill J., Laurie R. y Macknight R. (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* 26, 363-373.
- Quesada V., Macknight R., Dean C. y Simpson G.G. (2003). Autoregulation of *FCA* pre-mRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. *EMBO J.* 22, 3142-52.
- Quesada V., Dean C. y Simpson G.G. (2005). Regulated RNA processing in the control of *Arabidopsis* flowering. *Int. J. Dev. Biol.* 49(5-6), 773-80.
- Quivy J.P., Roche D., Kirschner D., Tagami H., Nakatani Y. y Almouzni G. (2004). A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *The EMBO J.* 23, 3516-3526.
- Raisner R.M., Hartley P.D., Meneghini M.D., Bao M.Z., Liu C.L., Schreiber S.L., Rando O.J. y Madhani H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233-248.
- Ramírez-Parra E. y Gutierrez C. (2007a). E2F Regulates *FASCIATA1*, a Chromatin Assembly Gene Whose Loss Switches on the Endocycle and Activates Gene Expression by Changing the Epigenetic Status1. *Plant Physiol.* 144, 105-120.
- Ramírez-Parra E. y Gutierrez C. (2007b). The many faces of CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1. *Trends Plant Sci.* 12(12), 570-6.
- Raskin I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 439- 463.
- Rasmussen L.J., Rasmussen M., Lutzen A., Bisgaard H.C. y Singh K.K. (2000). The human cyclin B1 modulates the sensitivity of DNA mismatch repair deficient cancer cells to alkylating agents. *Exp.Cell Res.* 257, 127-134.
- Ratcliffe O.J., Amaya I., Vincent C.A., Rothstein S., Carpenter R., Coen E.S. y Bradley D.J. (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* 125, 1609-15.
- Ratcliffe O.J., Nadzan G.C., Reuber T.L. y Riechmann J.L. (2001). Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an *FLC* homologue. *Plant Physiol.* 126, 122-132.
- Ratcliffe O.J., Kumimoto R.W., Wong B.J. y Riechmann J.L. (2003). Analysis of the *Arabidopsis* MADS AFFECTING FLOWERING gene family: *MAF2* prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell* 15, 1159-1169.
- Redei G.P. (1962). Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 47, 443-460.
- Reeves P.H. y Coupland G. (2001). Analysis of Flowering Time Control in *Arabidopsis* by Comparison of Double and Triple Mutants. *Plant Physiol.* 126, 1085-1091.

- Reeves P.H., Murtas G., Dash S. y Coupland G. (2002). *Early in short days 4*, a mutation in *Arabidopsis* that causes early flowering and reduces the mRNA abundance of the floral repressor *FLC*. *Development* 129, 5349-5361.
- Reidt W., Wurz R., Wanieck K., Chu H.H. y Puchta H. (2006). A homologue of the breast cancer-associated gene *BARD1* is involved in DNA repair in plants. *The EMBO J.* 25, 4326-4337.
- Reyes J.C. (2006). Chromatin modifiers that control plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 21-27.
- Riechmann J.L. y Meyerowitz E.M. (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378, 1079-1101.
- Rizhsky L., Davletova S., Liang H. y Mittler R. (2004). The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 279(12), 11736-43.
- Roe J.L., Rivin C.J., Sessions R.A., Feldmann K.A. y Zambryski P.C. (1993). The *TOUSLED* gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell* 75, 939-950.
- Romier C., Cocchiarella F., Mantovani R. y Moras D. (2003). The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J. Biol. Chem.* 278, 1336-1345.
- Ronceret A., Guilleminot J., Lincker F., Gadea-Vacas J., Delorme V., Bechtold N., Pelletier G., Delseny M., Chabouté M.E. y Devic M. (2005). Genetic analysis of two *Arabidopsis* DNA polymerase epsilon subunits during early embryogenesis. *Plant J.* 44(2), 223-36.
- Roxrud I., Lid S.E., Fletcher J.C., Schmidt E.D. y Opsahl-Sorteberg H.G. (2007). *GASA4*, one of the 14-member *Arabidopsis* GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant Cell Physiol.* 48(3), 471-83.
- Ruiz-García L., Madueño F., Wilkinson M., Haughn G., Salinas J. y Martínez-Zapater J.M. (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9, 1921-34.
- Ryan R.F., Schultz D.C., Ayyanathan K., Singh P.B., Friedman J.R., Fredericks W.J. y Rauscher F.J. (1999). KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4366-4378.
- Rytkönen A.K., Vaara M., Nethanel T., Kaufmann G., Sormunen R., Lära E., Nasheuer H.P., Rahmeh A., Lee M., Syväoja J.E. y Pospiech H. (2006). Distinctive activities of DNA polymerases during human DNA replication. *FEBS J.* 273, 2984-3001.
- Sablowski R. (2004). Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *TRENDS in Cell Biology* 14, 605-611.
- Saijo Y., Sullivan J.A., Wang H., Yang J., Shen Y., Rubio V., Ma L., Hoecker U. y Deng X.W. (2003). The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in *PHYTOCHROME A*-mediated regulation of *HY5* activity. *Genes Dev.* 17, 2642-2647.
- Samach A., Onouchi H., Gold S.E., Ditta G.S., Schwarz-Sommer Z., Yanofsky M.F. y Coupland G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288, 1613-1616.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shao H.B., Chu L.Y., Shao M.A., Jaleel C.A. y Mi H.M. (2008). Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C. R. Biol.* 331(6):433-41.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R. y Laux T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811-814.
- Sawa M., Nusinow D.A., Kay S.A. y Imaizumi T. (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 318(5848), 261-5.
- Schaffer R., Ramsay N., Samach A., Corden S., Putterill J., Carré I.A. y Coupland G. (1998). The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93, 1219-1229.
- Schmid M., Uhlenhaut N.H., Godard F., Demar M., Bressan R., Weigel D. y Lohmann J.U. (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130, 6001-6012.
- Schmitz R.J. y Amasino R.M. (2007). Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta* 1769(5-6):269-75.

- Schmitz R.J., Sung S. y Amasino R.M.** (2008). Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of *FLC* in winter-annual *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(2), 411-6.
- Schmitz R.J., Tamada Y., Doyle M.R., Zhang X. y Amasino R.M.** (2009). Histone H2B Deubiquitination Is Required for Transcriptional Activation of *FLOWERING LOCUS C* and for Proper Control of Flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149(2), 1196-204.
- Schomburg F.M., Patton D.A., Meinke D.W. y Amasino R.M.** (2001). *FPA*, a gene involved in floral induction in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. *Plant Cell*, 13, 1427-1436.
- Schönrock N., Exner V., Probst A., Grisse W. y Hennig L.** (2006). Functional Genomic Analysis of CAF-1 Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 281(14), 9560–9568.
- Schroeder D.F., Gahrtz M., Maxwell B.B., Cook R.K., Kan J.M., Alonso J.M., Ecker J.R. y Chory J.** (2002). De-etiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Curr. Biol.* 12, 1462–1472.
- Schubert D., Primavesi L., Bishopp A., Roberts G., Doonan J., Jenuwein T. y Goodrich J.** (2006). Silencing by plant Polycombgroup genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J.* 25, 4638–4649.
- Schultz E.A. y Haughn G.W.** (1993). Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development* 119, 745-765.
- Schultz D.C., Ayyanathan K., Negorev D., Maul G.G. y Rauscher F.J.** (2002). *SETDB1*: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* 16, 919–932.
- Schwartz Y.B. y Pirrotta V.** (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20(3), 266-73.
- Schwechheimer C.** (2008). Understanding gibberellic acid signaling—are we there yet? *Curr Opin Plant Biol.* 11(1), 9-15.
- Schwede T., Kopp J., Guex N. y Peitsch M.C.** (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31, 3381-3385.
- Scortecci K.C., Michaels S.D. y Amasino R.M.** (2001). Identification of a MADS-box gene, *FLOWERING LOCUS M* that represses flowering. *Plant J.* 26, 229–236.
- Scortecci K.C., Michaels S.D. y Amasino R.M.** (2003). Genetic interactions between *FLM* and other flowering-time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 52, 915–922.
- Searle I. y Coupland G.** (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *The EMBO J.* 23, 1217–1222.
- Searle I., He Y., Turck F., Vincent C., Fornara F., Kröber S., Amasino R. y Coupland G.** (2006). The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signalling in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 20, 898-912.
- Seo H.S., Yang J.Y., Ishikawa M., Bolle C., Ballesteros M.L., Chua N.H.** (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by *SPA1*. *Nature* 423, 995–999.
- Serraj R. y Sinclair T.** (2002). Osmolyte accumulation: Can it really help increase in crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* 25, 333- 341.
- Serrano-Cartagena J., Candela H., Robles P., Ponce M.R., Pérez-Pérez J.M., Piqueras P. y Micol J.L.** (2000). Genetic analysis of incurvata mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. *Genetics* 156, 1363–1377.
- Sheldon C.C., Rouse D.T., Finnegan E.J., Peacock W.J. y Dennis E.S.** (2000a). The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3753-3758.
- Sheldon C.C., Burn J.E., Perez P.P., Metzger J., Edwards J.A., Peacock W.J. y Dennis E.S.** (1999). The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell.* 11(3), 445-58.
- Sheldon C.C., Finnegan E.J., Rouse D.T., Tadege M., Bagnall D.J., Helliwell C.A., Peacock W.J. y Dennis E.S.** (2000b). The control of flowering by vernalization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3(5), 418-22.
- Sheldon C.C., Conn A.B., Dennis E.S. y Peacock W.J.** (2002). Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *Plant Cell* 14(10), 2527-37.

- Sheldon C.C., Hills M.J., Lister C., Dean C., Dennis E.S. y Peacock W.J.** (2008). Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(6):2214-9.
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., Casero R.A. y Shi Y.** (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shibahara K. y Stillman B.** (1999). Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* 96, 575-85.
- Shindo C., Aranzana M.J., Lister C., Baxter C., Nicholls C., Nordborg M y Dean C.** (2005). Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in determining variation in flowering time of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138, 1163–1173.
- Shindo C., Lister C., Crevillen P., Nordborg M. y Dean C.** (2006). Variation in the epigenetic silencing of FLC contributes to natural variation in *Arabidopsis* vernalization response. *Genes Dev.* 20(22), 3079-83.
- Shirasu K. y Schulze-Lefert P.** (2000). Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44, 371–385.
- Shivji M.K., Podust V.N., Hübscher U. y Wood R.D.** (1995). Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase ϵ , in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* 34, 5011-5017.
- Shultz R.W., Tatineni V.M., Hanley-Bowdoin L. y Thompson W.F.** (2007). Genome-wide analysis of the core DNA replication machinery in the higher plants *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 144(4), 1697-714.
- Simon R., Igeno M.I. y Coupland G.** (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* 384, 59–62.
- Simpson G.G., Gendall A.R. y Dean C.** (1999). When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 99, 519–550.
- Simpson G.G. y Dean C.** (2002). *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* 296, 285-289.
- Simpson G.G., Dijkwel P.P., Quesada V., Henderson I. y Dean C.** (2003). FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell* 113(6), 777-87.
- Simpson G.G.** (2004). The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(5), 570-4.
- Smith J.S., Caputo E. y Boeke J.D.** (1999). A genetic screen for ribosomal DNA silencing defects identifies multiple DNA replication and chromatin-modulating factors. *Mol Cell Biol.* 19(4), 3184-97.
- Smith S. y Stillman B.** (1989). Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* 58, 15–25.
- Smolen G.A., Pawlowski L., Wilensky S.E. y Bender J.** (2002). Dominant Alleles of the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor ATR2 Activate Stress-Responsive Genes in *Arabidopsis*. *Genetics* 161, 1235–1246.
- Smothers J.F. y Henikoff S.** (2000). The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr. Biol.* 10(1), 27-30.
- Soliman M.A. y Riabowol K.** (2007). After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci.* 32(11), 509-19.
- Somers D.E., Devlin P.F. y Kay S.A.** (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 280, 282(5393), 1488-90.
- Soppe W.J., Bentsink L. y Koornneef M.** (1999). The early-flowering mutant *efs* is involved in the autonomous promotion pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 126, 4763-4770.
- Squazzo S.L., Costa P.J., Lindstrom D.L., Kumer K.E., Simic R., Jennings J.L., Link A.J., Arndt K.M. y Hartzog, G.A.** (2002). The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo. *EMBO J.* 21, 1764–1774.
- Stark G.R. y Taylor W.R.** (2006). Control of the G2/M transition. *Mol. Biotechnol.* 32, 227–248.
- Stillman B.** (2008). DNA Polymerases at the Replication Fork in Eukaryotes. *Molecular Cell* 30, 259-260.
- Strayer C., Oyama T., Schultz T.F., Raman R., Somers D.E., Más P., Panda S., Kreps J.A. y Kay S.A.** (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289, 768-771.
- Streitner C., Danisman S., Wehrle F., Schöning J.C., Alfano J.R. y Staiger D.** (2008). The small glycine-rich RNA binding protein *AtGRP7* promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56(2), 239-50.
- Stucki M., Pascucci B., Parlanti E., Fortini P., Wilson S.H., Hübscher U. y Dogliotti E.** (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 17, 835-843.
- Suárez-López P., Wheatley K., Robson F., Onouchi H., Valverde F. y Coupland G.** (2001). *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410(6832), 1116-20.

- Sugino A., Ohara T., Sebastian J., Nakashima N. y Araki H.** (1998). DNA polymerase ϵ encoded by *CDC20+* is required for chromosomal DNA replication in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 3, 99-110.
- Sun T. y Kamiya Y.** (1994). The *Arabidopsis* *GA1* locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 6, 1509-1518.
- Sung S. y Amasino R.M.** (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* 427(6970), 159-64.
- Sung S. y Amasino R.M.** (2005). Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 491-508.
- Sung S. y Amasino R.M.** (2006). Molecular genetic studies of the memory of winter. *J. Exp. Bot.* 57(13):3369-77.
- Sung S., He Y., Eshoo T.W., Tamada Y., Johnson L., Nakahigashi K., Goto K., Jacobsen S.E. y Amasino R.M.** (2006a). Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1*. *Nat Genet* 38, 706-710.
- Sung S., Schmitz R.J. y Amasino R.M.** (2006b). A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20(23), 3244-8.
- Sung Z.R., Chen L.J., Moon Y.H. y Lerpiriyapong K.** (2003). Mechanisms of floral repression in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 6, 29-35.
- Suzuki T., Inagaki S., Nakajima S., Akashi T., Ohto M.A., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Nakamura K. y Morikami A.** (2004). A novel *Arabidopsis* gene *TONSOKU* is required for proper cell arrangement in root and shoot apical meristems. *Plant J.* 38, 673-684.
- Swiezewski S., Crevillen P., Liu F., Ecker J.R., Jerzmanowski A. y Dean C.** (2007). Small RNA-mediated chromatin silencing directed to the 3' region of the *Arabidopsis* gene encoding the developmental regulator, FLC. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(9), 3633-8.
- Takada S. y Goto K.** (2003). *TERMINAL FLOWER2*, an *Arabidopsis* homolog of *HETEROCHROMATIN PROTEIN1*, counteracts the activation of *FLOWERING LOCUS T* by constans in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* 15, 2856-2865
- Takami Y., Ono T., Fukagawa T., Shibahara K. y Nakayama T.** (2007). Essential Role of CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR-1-mediated Rapid Nucleosome Assembly for DNA Replication and Cell Division in Vertebrate Cells. *Molecular Biology of the Cell* 18, 129-141.
- Takeda S., Tadele Z., Hofmann I., Probst A.V., Angelis K.J., Kaya H., Araki T., Mengiste T., Scheid O.M. y Shibahara K.** (2004). *BRU1*, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18, 782-793.
- Takubo K., Morikawa T., Nonaka Y., Mizutani M., Takenaka S., Takabe K., Takahashi M.A. y Ohta D.** (2003). Identification and molecular characterization of mitochondrial ferredoxins and ferredoxin reductase from *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 52(4), 817-30.
- Talon M., Koornneef M. y Zeevaart J.A.** (1990). Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(20), 7983-7.
- Tamaki S., Matsuo S., Wong H.L., Yokoi S. y Shimamoto K.** (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316(5827), 1033-6.
- Tamura K., Adachi Y., Chiba K., Oguchi K. y Takahashi H.** (2002). Identification of *Ku70* and *Ku80* homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. *Plant J.* 29(6), 771-81.
- Telfer A., Bollman K. y Poethig S. R.** (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 645-654.
- Telfer A. y Poethig R.S.** (1998). *HASTY*: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125, 1889-1898.
- Teper-Bamnolker P. y Samach A.** (2005). The flowering integrator *FT* regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 17, 2661- 75.
- Tepperman J.M., Hwang Y.S. y Quail P.H.** (2006). phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of *Arabidopsis* seedling de-etiolation. *Plant J.* 48, 728-742.

- Thiru A., Nietlispach D., Mott H.R., Okuwaki M., Lyon D., Nielsen P.R., Hirshberg M., Verreault A., Murzina N.V., y Laue E.D.** (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J.* 23, 489–499.
- Todd J., Post-Beittenmiller D. y Jaworski J.G.** (1999). *KCS1* encodes a fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase affecting wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2, 119–30.
- Truernit E. y Sauer N.** (1995). The promoter of the *Arabidopsis thaliana* *SUC2* sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by *SUC2*. *Planta* 196 (3), 564–570.
- Tsubota T., Maki S., Kubota H., Sugino A., y Maki, H.** (2003). Double-stranded DNA binding properties of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase epsilon and of the DPB3p-DPB4p subassembly. *Genes Cells* 8, 873–888.
- Tsubota T., Tajima R., Ode K., Kubota H., Fukuhara N., Kawabata T., Maki S. y Maki H.** (2006). Double-stranded DNA binding, an unusual property of DNA polymerase epsilon, promotes epigenetic silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 281(43), 32898–908.
- Tsukaya H.** (2002). Interpretation of mutants in leaf morphology: genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between Cell and Organismal theory. *Int. Rev. Cytol.* 217, 1–39.
- Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P. y Zhang, Y.** (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811–816.
- Turck F., Roudier F., Farrona S., Martin-Magniette M.L., Guillaume E., Buisine N., Gagnot S., Martienssen R.A., Coupland G. y Colot V.** (2007). *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet* 3, e86.
- Turck F., Fornara F. y Coupland G.** (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu Rev Plant Biol.* 59, 573–94.
- Tuteja N., Ahmad P., Panda B.B. y Tuteja R.** (2009). Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat. Res.* 681(2–3), 134–49.
- Tzafrir I., Pena-Muralla R., Dickerman A., Berg M., Rogers R., Hutchens S., Sweeney T.C., McElver J., Aux G., Patton D. y Meinke D.** (2004). Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 1206–1220.
- Ubersax J. A., Woodbury E. L., Quang P. N., Paraz M., Blethrow J. D., Shah K., Shokat K.M. y Morgan D.O.** (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, 859–864.
- Vaillant I. y Paszkowski J.** (2007). Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10(5):528–33.
- Valverde F., Mouradov A., Soppe W., Ravenscroft D., Samach A. y Coupland G.** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303, 1003–1006.
- Vanacker H., Lu H., Rate D.N. y Greenberg J.T.** (2001). A role for salicylic acid and *NPR1* in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 28, 209–216.
- Vassallo M.F. y Tanese N.** (2002). Isoform-specific interaction of HP1 with human TAFII130. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5919–5924.
- Veley K.M. y Michaels S.D.** (2008). Functional redundancy and new roles for genes of the autonomous floral-promotion pathway. *Plant Physiol.* 147(2), 682–95.
- Verdeil J.L., Alemanno L., Niemenak N. y Tranbarger T.J.** (2007). Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci.* 12(6):245–52.
- Vermaak D., Ahmad K., Henikoff S.** (2003). Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15(3), 266–74.
- Vernoud V., Horton A.C., Yang Z. y Nielsen E.** (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131(3), 1191–208.
- Verreault A., Kaufman P. D., Kobayashi R. y Stillman B.** (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87, 95–104.
- Veyres N., Danon A., Aono M., Galliot S., Karibasappa Y.B., Diet A., Grandmottet F., Tamaoki M., Lesur D., Pilard S., Boitel-Conti M., Sangwan-Norreel B.S. y Sangwan R.S.** (2008). The *Arabidopsis* sweetie mutant is

- affected in carbohydrate metabolism and defective in the control of growth, development and senescence. *Plant J.* 55(4), 665-86.
- Wagner D. y Meyerowitz E.M.** (2002). *SPLAYED*, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 12, 85–94.
- Walbot V.** (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 43, 49-82.
- Wang C. y Liu Z.** (2006). *Arabidopsis* ribonucleotide reductase are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell* 2, 350-65.
- Wang H. y Elledge S.J.** (1999) DRC1, DNA replication and checkpoint protein 1, functions with DPB11 to control DNA replication and the S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(7), 3824-9.
- Wang H.Y., Klatte M., Jakoby M., Bäumlein H., Weisshaar B. y Bauer P.** (2007b). Iron deficiency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 226(4), 897-908.
- Wang X., Zhang Y., Ma Q., Zhang Z., Xue Y., Bao S. y Chong K.** (2007a). *SKB1*-mediated symmetric dimethylation of histone H4R3 controls flowering time in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 26(7), 1934-41.
- Wang Y., Liu J., Xia R., Wang J., Shen J., Cao R., Hong X., Zhu J.K. y Gong Z.** (2007d). The protein kinase TOUSLED is required for maintenance of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 8(1), 77-83.
- Wang Y., Wan H., Liao H., Zhuang C., Ma H. y Yan X.** (2007c). Molecular Analyses of the Plant WNK Gene Family and Evidence for their Regulation of Flowering Time in *Arabidopsis*. 18TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON ARABIDOPSIS RESEARCH.
- Wang Z., Wu X. y Friedberg E.C.** (1993). DNA repair synthesis during base excision repair in vitro is catalyzed by DNA polymerase ϵ and is influenced by DNA polymerases α and δ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1051-1058.
- Wang Z.Y. y Tobin E.M.** (1998). Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93, 1207–1217.
- Weigel D., Alvarez J., Smyth D.R., Yanofsky M.F., y Meyerowitz E.M.** (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69, 843-859.
- Weigel D. y Nilsson O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377, 495-500.
- Weill J.C. y Reynaud C.A.** DNA polymerases in adaptive immunity. (2008) *Nat. Rev. Immunol.* 8(4), 302-12.
- Wellensiek S.J.** (1962). Dividing cells as the locus for vernalization. *Nature* 195, 307–308.
- Wellensiek S.J.** (1964). Dividing cells as the prerequisite for vernalization. *Plant Physiol.* 39, 832–835.
- West C.E., Waterworth W.M., Story G.W., Sunderland P.A., Jiang Q. y Bray C.M.** (2002). Disruption of the *Arabidopsis AtKu80* gene demonstrates an essential role for *AtKu80* protein in efficient repair of DNA double-strand breaks in vivo. *Plant J.* 31(4), 517-28.
- West C.E., Waterworth W.M., Sunderland P.A. y Bray C.M.** (2004). *Arabidopsis* DNA double-strand break repair pathways. *Biochemical Society Transactions* 32, part 6 NASCARRAYS-67.
- Werner J.D., Borevitz J.O., Warthmann N., Trainer G.T., Ecker J.R., Chory J. y Weigel D.** (2005). Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an FLM deletion as a cause for natural flowering-time variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(7), 2460-5.
- Wigge P.A., Kim M.C., Jaeger K.E., Busch W., Schmid M., Lohmann J.U. y Weigel D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309, 1056–59.
- Wilson R.N., Heckman J.W y Somerville C.R.** (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* 100, 403-408.
- Wood C.C., Robertson M., Tanner G., Peacock W.J., Dennis E.S. y Helliwell C.A.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103(39), 14631-6.
- Wu H., Li L., Du J., Yuan Y., Cheng X. y Ling H.Q.** (2005). Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46(9), 1505-14.
- Wu K., Zhang L., Zhou C., Yu C.W. y Chaikam V.** (2008). *HDA6* is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 59(2), 225-34.

- Wysocka-Diller J.W., Helariutta Y., Fukaki H., Malamy J.E. y Benfey P.N.** (2000). Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127, 595–603.
- Xia R., Wang J., Liu C., Wang Y., Wang Y., Zhai J., Liu J., Hong X., Cao X., Zhu J.K. y Gong Z.** (2006). *ROR1/RPA2A*, a Putative Replication Protein A2, Functions in Epigenetic Gene Silencing and in Regulation of Meristem Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, Vol. 18, 85–103.
- Xing D., Zhao H., Xu R. y Li Q.Q.** (2008). *Arabidopsis PCFS4*, a homologue of yeast polyadenylation factor Pcf11p, regulates *FCA* alternative processing and promotes flowering time. *Plant J.* 54(5), 899-910.
- Xu L. y Shen W.H.** (2008). Polycomb silencing of *KNOX* genes confines shoot stem cell niches in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 23;18(24), 1966-71.
- Xu L., Ménard R., Berr A., Fuchs J., Cognat V., Meyer D. y Shen W.H.** (2009). The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, *AtUBC1* and *AtUBC2*, play redundant roles and are involved in activation of *FLC* expression and repression of flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 57(2), 279-88.
- Yalpani N., Enyedi A.J., León J. y Raskin, I.** (1994). UV light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta*, 193, 372– 376.
- Yamaguchi A., Kobayashi Y., Goto K., Abe M. y Araki T.** (2005). *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant Cell Physiol.* 46, 1175–89.
- Yamamoto A., Bhuiyan M.N., Waditee R., Tanaka Y., Esaka M., Oba K., Jagendorf A.T. y Takabe T.** (2005). Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and *Arabidopsis* plants. *J. Exp. Bot.* 56(417), 1785-96.
- Yang J., Lin R., Hoecker U., Liu B., Xu L. y Wang H.** (2005). Repression of light signaling by *Arabidopsis* SPA1 involves post-translational regulation of HFR1 protein accumulation. *Plant J.* 43, 131–141.
- Yanovsky M.J. y Kay S.A.** (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419, 308–312.
- Yanovsky M.J. y Kay S.A.** (2003). Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 265–275.
- Yao J., Roy-Chowdhury S. y Allison L.A.** (2003). *AtSig5* Is an Essential Nucleus-Encoded *Arabidopsis* -Like Factor1. *Plant Physiol.* 132, 739-747.
- Yi H., Sardesai N., Fujinuma T., Chan C., Veena W. y Gelvin S.** (2006). Constitutive expression exposes functional redundancy between the *Arabidopsis* histone H2A gene *HTA1* and other H2A gene family members. *Plant Cell* 18, 1575-1589.
- Yoo C.Y., Miura K., Jin J.B., Lee J., Park H.C., Salt D.E., Yun D.J., Bressan R.A. y Hasegawa P.M.** (2006). *SlZ1* small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in *Arabidopsis* independent of salicylic acid. *Plant Physiol.* 142, 1548-1558.
- Yoo S.Y., Kardailsky I., Lee J.S., Weigel D. y Ahn J.H.** (2004). Acceleration of flowering by overexpression of *MFT* (*MOTHER OF FT AND TFL1*). *Mol. Cells* 17, 95–101.
- Yoo S.K., Chung K.S., Kim J., Lee J.H., Hong, S.M., Yoo S.J., Yoo S.Y., Lee J.S. y Ahn J.H.** (2005). *CONSTANS* Activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 770–778.
- Yoo S.Y., Kim Y., Kim S.Y., Lee J.S. y Ahn J.H.** (2007). Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2(7), e642.
- Yoshida N., Yanai Y., Chen L., Kato Y., Hiratsuka J., Miwa T., Sung Z.R. y Takahashi S.** (2001). *EMBRYONIC FLOWER2*, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2471–2481.
- Yu H., Xu Y., Tan E.L. y Kumar P.P.** (2002). *AGAMOUS-LIKE 24*, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(25), 16336-41.
- Yu H., Ito T., Wellmer F. y Meyerowitz E.M.** (2004). Repression of *AGAMOUS-LIKE 24* is a crucial step in promoting flower development. *Nat. Genet.* 36(2), 157-61.
- Yu J.W., Rubio V., Lee N.Y., Bai S., Lee S.Y., Kim S.S., Liu L., Zhang Y., Irigoyen M.L., Sullivan J.A., Zhang Y., Lee I., Xie Q., Paek N.C. y Deng X.W.** (2008). *COP1* and *ELF3* control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Mol. Cell.* 32(5), 617-30.

- Zeevaart J.A.D.** (1983). Gibberellins and flowering. In *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, Vol. 2, A. Crozier, ed (New York: Praeger Scientific), 333–374.
- Zhang H., Roberts D.N. y Cairns B.R.** (2005). Genome-wide dynamics of *Htz1*, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123 219-231.
- Zhang X., Germann S., Blus B.J., Khorasanizadeh S., Gaudin V. y Jacobsen S.E.** (2007). The *Arabidopsis* LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys 27 trimethylation. *Nat Struct Mol Biol* 14, 869–871.
- Zhang Z., Shibahara K., Stillman B.** (2000). PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 408, 221–225.
- Zhao Z., Yu Y., Meyer D., Wu C. y Shen W.H.** (2005). Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. *Nat. Cell Biol.* 7, 1256-1260.
- Zhu J.K.** (2001). Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4(5), 401-6.
- Zhu J.K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Plant Biol.* 6, 441-445.
- Zhu J.K., Verslues P.E., Zheng X., Lee B.H., Zhan X., Manabe Y., Sokolchik I., Zhu Y., Dong C.H., Zhu J.K., Hasegawa P.M. y Bressan R.A.** (2005). *HOS10* encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(28), 9966-71.